

**Implicación de la bomba de expulsión AcrAB-TolC en la resistencia
a antimicrobianos y en la virulencia del microorganismo patógeno
*Enterobacter cloacae***

Tesis Doctoral

Astrid Pérez Gómez

Marzo 2012

Tesis Doctoral dirigida por el **Dr. Germán Bou Arévalo** y la **Dra. Margarita Poza Domínguez**.

Servicio de Microbiología-Instituto de Investigación Biomédica A Coruña.

Complejo Hospitalario Universitario A Coruña

Los directores de esta tesis doctoral, D. Germán Bou Arévalo, Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid, Jefe de Servicio de Microbiología del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña y profesor de la Universidad de Santiago de Compostela y Dña. Margarita Poza Domínguez, Doctora en Biología por la Universidad de Santiago de Compostela, Investigadora del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña; junto con la tutora, Dña. Ángeles Cid Blanco, Doctora en Biología, Profesora Titular en la Universidad de A Coruña.

CERTIFICAN:

Que Dña. Astrid Pérez Gómez, Licenciada en Biología por la Universidad de Santiago de Compostela, ha realizado en el Servicio de Microbiología y en el Instituto de Investigación Biomédica (INIBIC) del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, y bajo su dirección y tutela, respectivamente, el trabajo **“Implicación de la bomba de expulsión AcrAB-TolC en la resistencia a antimicrobianos y en la virulencia del microorganismo patógeno *Enterobacter cloacae*”**, el cual, reúne todas las condiciones para ser presentado como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en A Coruña, Marzo de 2012.

Dr. Germán Bou Arévalo

Director

Dra. Margarita Poza Domínguez

Codirectora

Dra. Ángeles Cid Blanco

Tutora

Aos meus avós

AGRADECEMENTOS

Chegou o momento de dar as grazas, e agora que me poño a escribir, vexo que non é unha tarefa doada. Durante todos estes anos, foron moitas as persoas que dun xeito ou outro me axudaron neste traballo e aos que lle quero agradecer o apoio, ánimo e confianza que me deron de xeito desinteresado. Algunhas están aquí comigo e outras nos meus recordos.

En primeiro lugar quérolle dar as grazas aos meus directores de tese, Germán Bou e Margarita Poza, pola súa axuda inestimable, polos seus consellos, paciencia e dedicación, sen dúbida sen eles este traballo non saíría adiante. Germán, grazas por darme a oportunidade de traballar contigo. Codi, grazas por incluír no meu vocabulario a palabra *espeluznante*, por estar sempre aí e cando foi *menester* poñer coto a tanta *tropelía*.

En segundo lugar quérolle dar as grazas a miña familia, polo seu apoio incondicional incluso cando saben que me estou a equivocar. Como di miña nai “fai o que vexas, total halo facer igual”. Grazas mamá e papá por animarme sempre a facer o que me propoño. Á miña tía, por coidarme e preocuparse sempre por min, incluso nos momentos máis difíciles, botareite de menos sempre tía. Ás miñas irmás, por ser como son, e aturarme, que sei que non sempre é doado, grazas monas por estar sempre o meu lado. E como non, gracias cuñados por aturar as miñas irmás que aínda é máis complicado, e por estar dispostos sempre a botar unha man. Ao meu “irmán” pequeno, meu curmán, aínda que pensa que estou tola, sei que é o meu mellor publicista. E non me quero esquecer do maior admirador do meu traballo, o meu sobriño, gracias Mauriño por agardar por min para xogar aos experimentos.

Tamén lle quero dar as grazas á miña segunda familia, aos meus amigos, os de sempre e os que non o son, rapaces non sei que faría sin vós todos estes anos, grazas por TODO. Teremos que estrear a “calle” como se merece, ¿non?

E por último, ¿qué podo dicir das miñas compañeiras e meus compañeiros de traballo?, ESPELUZNANTE. Moitas grazas raparigos pola vosa colaboración e sobre todo por facer que cada día sexa diferente e divertido, é un pracer e un luxo traballar con vós. Como xa sabedes o que estivo no “lab” é do “lab”, espero seguir facendo astrizadas durante moito tempo con vós, se non xa sabedes, paremos onde paremos, sempre nos quedará a feira do viño e a viaxe de inverno.

Con todo isto o que quería dicir é GRAZAS a TODOS.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| ABREVIATURAS..... | 11 |
| 1. INTRODUCCIÓN. | 13 |
| 1.1. La familia Enterobacteriaceae. El patógeno <i>Enterobacter cloacae</i>. | 16 |
| 1.1.1. Hábitat natural e importancia clínica. | 18 |
| 1.1.2. Factores de virulencia y patogénesis. | 20 |
| 1.1.3. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos. | 23 |
| 1.1.3.1. Producción de enzimas inactivadores de antibióticos. | 24 |
| 1.1.3.2. Alteración de la diana del antimicrobiano..... | 26 |
| 1.1.3.3. Control de la permeabilidad de membrana: expresión de porinas de membrana externa y bombas de expulsión. | 27 |
| 1.2. Bombas de expulsión..... | 28 |
| 1.2.1. Clasificación de las bombas de expulsión. | 30 |
| 1.2.2 Transportadores RND: AcrAB-TolC..... | 34 |
| 1.2.2.1. Estructura de AcrAB-TolC. | 34 |
| 1.2.2.2. Sustratos de bombas de expulsión..... | 37 |
| 1.2.3. Regulación de la expresión de las bombas de expulsión: control de la expresión del operón <i>acrAB</i> | 39 |
| 1.2.4. Bombas de expulsión y desarrollo de resistencia a antibióticos. | 44 |

| | |
|---|-----------|
| 1.2.5. Bombas de expulsión y virulencia bacteriana. | 45 |
| 2. OBJETIVOS | 49 |
| 3. CAPÍTULOS | 53 |
| 3.1. Capítulo I: Caracterización de la bomba de expulsión AcrAB-TolC de <i>Enterobacter cloacae</i> y análisis de su implicación en la resistencia a antibióticos en un aislamiento clínico. | 55 |
| 3.2. Capítulo II: Implicación de la bomba de expulsión AcrAB-TolC en la resistencia, en la <i>fitness</i> y la virulencia de <i>Enterobacter cloacae</i> | 57 |
| 3.3. Capítulo III: Efecto de los activadores transcripcionales SoxS, RobA y RamA en la expresión de la bomba de expulsión multidroga AcrAB-TolC en <i>Enterobacter cloacae</i> | 59 |
| 4. DISCUSIÓN..... | 63 |
| 4.1. Discusión capítulo I. | 65 |
| 4.2. Discusión capítulo II. | 69 |
| 4.3. Discusión capítulo III. | 73 |
| 4.4. Consideraciones finales..... | 79 |
| 5. CONCLUSIONES. | 81 |
| 6. REFERENCIAS..... | 85 |
| 7. ANEXOS..... | 99 |
| 7.1. Artículo capítulo I..... | 101 |
| 7.2. Artículo capítulo II..... | 109 |
| 7.3. Artículo capítulo III..... | 117 |
| 7.4. <i>Curriculum Vitae</i> | 159 |

ABREVIATURAS

| | |
|------|---|
| Å | Amstrong |
| ABC | <i>ATP binding cassette</i> |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNm | ARN mensajero |
| Asp | Ácido aspártico |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| BLEE | β-lactamasa de espectro extendido |
| CMI | Concentración mínima inhibitoria |
| CPM | Concentración preventiva de mutantes |
| CSF | Fluido cerebroespinal |
| DEC | Decanoato |
| EtBr | Bromuro de etidio |
| GFP | <i>Green fluorescent protein</i> |
| HTH | <i>Helix-turn-helix</i> |
| IC | Índice de competición |
| LPS | Lipopolisacárido |
| MATE | <i>Multidrug and toxic-compound extrusion</i> |
| MDCK | <i>Madin-Darby Canine Kidney</i> |
| MDR | <i>Multidrug resistance</i> |
| MFP | Proteína de fusión a membrana |
| MFS | <i>Major facilitator superfamily</i> |
| MP | Membrana proximal |
| NBD | Dominio de unión a nucleótidos |
| NC | No conocido |
| OMF | Factor de membrana externa |
| OMP | Proteína de membrana externa |
| PAβN | Phe-arg-β-naftilamida |
| pb | Pares de bases |

Abreviaturas

| | |
|--------|---------------------------------------|
| PBP | Proteína de unión a la penicilina |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PQ | Paraquat |
| RND | <i>Resistance nodulation division</i> |
| RT-PCR | PCR de transcripción reversa |
| SAL | Salicilato |
| SDS | Dodecilsulfato sódico |
| SMR | <i>Small multidrug resistance</i> |
| SSTT | Sistema de secreción tipo III |
| TET | Tetraciclina |
| TMD | Dominio transmembrana |
| TR | Tracto respiratorio |
| TU | Tracto urinario |

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades infecciosas representan en la actualidad un importante problema de salud por su morbilidad y por las implicaciones económicas que tiene para el sistema sanitario. A pesar de los grandes progresos alcanzados en el conocimiento de la epidemiología, etiología, patología, profilaxis y tratamiento, las infecciones continúan teniendo una prevalencia elevada. Los antibióticos han sido el logro más importante de la medicina durante el siglo XX. No sólo constituyen la causa directa de la disminución de la morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas de etiología bacteriana sino que, además, han proporcionado el desarrollo de otras áreas médicas mediante el control de la infección.

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928 la principal inquietud de los clínicos a la hora de tratar enfermedades infecciosas graves ha sido la resistencia. Muchos de los antibióticos disponibles en la actualidad están obsoletos o no son efectivos debido a la enorme plasticidad genética de las bacterias la cual les permite adaptarse y evolucionar hacia la resistencia, así como a la aparición de nuevos patógenos emergentes portadores, en muchos casos, de resistencias intrínsecas.

"It is not difficult to make microbes resistant to penicillin in the laboratory by exposing them to concentrations not sufficient to kill them, and the same thing has occasionally happened in the body. The time may come when penicillin can be bought by anyone in the shops. Then there is the danger that the ignorant man may easily under dose himself and by exposing his microbes to non-lethal quantities of the drug make them resistant"

Alexander Fleming,

Estocolmo, Diciembre, 1945

Ante la ausencia de terapias eficaces, es necesario crear nuevas estrategias para optimizar y proteger el uso de los antibióticos disponibles, así como diseñar nuevas moléculas, basadas en nuevas dianas terapéuticas, útiles para combatir los microorganismos multirresistentes. El fenómeno de multirresistencia está frecuentemente asociado con la hiperexpresión de los transportadores que reconocen y expulsan eficientemente al exterior de la célula un amplio rango de compuestos estructuralmente no relacionados. Los antibióticos usados en clínica están entre estos compuestos y su expulsión reduce significativamente su utilidad. De entre todos los transportadores descritos, las

bombas de expulsión pertenecientes a la familia RND (*resistance-nodulation-division*) son las más relevantes desde el punto de vista clínico. Estos sistemas son capaces de reconocer tanto antibióticos relevantes como biocidas, ambos ampliamente usados en el ambiente hospitalario. Este hecho motivó el debate acerca de la co-resistencia antibiótico-biocida y la posible selección mediante biocidas de cepas resistentes a múltiples antibióticos. Ciertamente, estudios *in vitro* han confirmado que cepas resistentes a biocidas hiperexpresan bombas de expulsión convirtiéndose en cepas multirresistentes (1, 2). La adaptación de las bacterias a condiciones de estrés exterior es un paso clave en la emergencia de cepas multirresistentes, siendo éstas una seria amenaza para la salud humana. Esta respuesta inducida por estrés podría desencadenar mecanismos preliminares disparando la línea de defensa inicial de la bacteria en contra de la antibioterapia. Entre las bacterias multirresistentes emergentes, *Enterobacter spp.* ha sido reconocido como un importante patógeno nosocomial (3). Dentro de este género, *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter cloacae* son las especies aisladas con mayor frecuencia en los hospitales y, sin embargo, poco se sabe acerca de su potencial patogénico. En términos generales, en el presente trabajo se aborda el estudio estructural así como de regulación de una bomba de expulsión como ejemplo de mecanismo de resistencia capaz de desencadenar un fenotipo de multirresistencia (MDR) en *E. cloacae* (Figura 1.1).

1.1. La familia Enterobacteriaceae. El patógeno *Enterobacter cloacae*.

Los miembros de la familia Enterobacteriaceae son bacterias Gram-negativas no formadores de esporas, anaerobios facultativos, fermentan glucosa y otros azúcares, reductores de nitrato a nitrito, catalasa positivo y oxidasa negativo (excepto *Plesiomonas*). Aunque el hábitat natural de muchos miembros de la familia Enterobacteriaceae clínicamente relevantes es el tracto gastrointestinal de humanos y otros animales, estos organismos están ampliamente distribuidos en la naturaleza encontrándose, por ejemplo, en el agua y en la tierra (4). Causan una amplia variedad de infecciones, tanto en la comunidad como en el ambiente hospitalario, afectando tanto a hospedadores sanos como a aquellos con enfermedades previas. Ciertas especies pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae representan el 50% de todos los aislamientos que se obtienen a partir de muestras procedentes de infecciones hospitalarias y, el 80% de todas las infecciones

producidas por bacterias Gram-negativas (5). Aunque los aislamientos más frecuentes

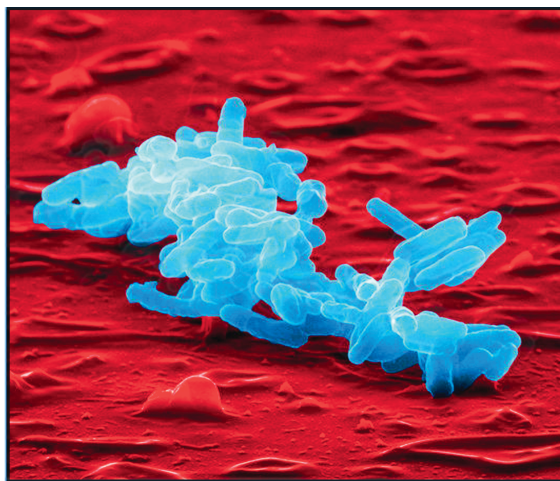


Figura 1.1: Imagen coloreada de un grupo de bacterias *Enterobacter cloacae* obtenida mediante microscopía electrónica de barrido. Foto de Eye of Science/Science Photo Library (imagen nºb220845)

proceden en su inmensa mayoría del tracto urinario, la sangre, la cavidad peritoneal y el tracto respiratorio, estas bacterias también pueden ser aisladas a partir de otros lugares como el líquido cefalorraquídeo, el líquido sinovial o abscesos, entre otras localizaciones.

Tres especies de *Enterobacter*, *E. cloacae*, *E. aerogenes* y *E. sakazakii*, son las responsables de la gran mayoría de las infecciones causadas por el género *Enterobacter*. *Pantoea agglomerans*,

hasta ahora conocida como *Enterobacter agglomerans*, se encuentra también con frecuencia. Estas cuatro especies de bacterias fermentan la lactosa, son móviles y forman colonias de aspecto mucoide. Distintas cepas de *Enterobacter* surgen frecuentemente de la flora intestinal de pacientes hospitalizados, aunque pueden aparecer en brotes con un origen común y propagarse de paciente a paciente. Las infecciones son especialmente comunes en pacientes que han recibido terapia antimicrobiana y en aquellos ingresados en unidades de cuidados intensivos (3). Son capaces de causar una amplia variedad de infecciones nosocomiales tales como neumonía, infecciones del tracto urinario e intestinal, infecciones de heridas y quemaduras, infecciones de dispositivos intravasculares y otras prótesis o meningitis. Aparentemente, no hay características distintivas entre las infecciones causadas por las diferentes especies incluidas dentro del género. *E. cloacae*, *E. aerogenes* y la mayor parte de cepas de *E. sakazakii* son intrínsecamente resistentes a ampicilina y cefalosporinas de primera y segunda generación (Tabla 1.1) como resultado de la expresión de la β -lactamasa cromosómica inducible *ampC* controlada por reguladores que inducen o reprimen su expresión (6). Algunas cepas de *E. sakazakii* puede ser sensibles a ampicilina, cefalotina y cefoxitina debido a la ausencia de esta β -lactamasa cromosómica inducible. Además, cepas que producen constitutivamente altos niveles de β -lactamasa son resistentes a cefalosporinas de tercera generación, generalmente como resultado de mutaciones en

los *loci* reguladores. Estas cepas hiperproductoras de AmpC están ya presentes en la mayoría de pacientes con infecciones causadas por *Enterobacter* antes del inicio del tratamiento. Del mismo modo que otros miembros de la familia Enterobacteriaceae, ciertas especies pertenecientes al género *Enterobacter* pueden llevar plásmidos portadores de genes de resistencia a múltiples agentes antimicrobianos. Las cepas de *E. sakazakii* tienden a ser sensibles a aminoglucósidos. Esto podría indicar que esta especie no forma parte de la flora hospitalaria normal por lo que tendría menos oportunidades que *E. cloacae* o *E. aerogenes* de captar plásmidos que codifican enzimas inactivadores de aminoglucósidos (3). El tratamiento de las infecciones causadas por *Enterobacter* debe ser adaptado a aislamientos individuales basado en el test de sensibilidad a antibióticos o antibiograma. Sin embargo, los clínicos son conscientes de que la emergencia de cepas resistentes puede llevar a un fallo terapéutico empleando cefalosporinas de tercera generación, incluso cuando los aislamientos son sensibles en el test inicial (7).

Tabla 1.1 Sensibilidad antibiótica de las cuatro cepas de *Enterobacter* más frecuentemente aisladas de material clínico (3).

| Antibiótico | CMI ₅₀ /CMI ₉₀ para las siguientes cepas (no. de cepas testadas) ^a : | | | |
|----------------|---|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| | <i>E. sakazakii</i> (195) | <i>E. agglomerans</i> (27) | <i>E. aerogenes</i> (25) | <i>E. cloacae</i> (29) |
| Ampicilina | 2/4 | 32/>128 | >128/>128 | >128/>128 |
| Piperacilina | 2/2 | 4/32 | 4/>128 | 4/>128 |
| Cefalotina | 64/128 | 16/>128 | >128/>128 | >128/>128 |
| Cefamandol | 2/4 | 2/>128 | 4/>128 | 8/>128 |
| Cefoxitina | 8/16 | 8/>128 | >128/>128 | >128/>128 |
| Cefotaxima | 0.12/0.12 | 0.25/32 | 0.12/0.5 | 0.25/8 |
| Imipenem | 0.12/0.25 | 0.5/0.5 | 1.0/2.0 | 0.5/1.0 |
| Gentamicina | 0.25/0.5 | 0.5/1.0 | 0.5/32 | 0.5/8.0 |
| Ciprofloxacino | ≤0.06/≤0.06 | ≤0.06/1.0 | ≤0.06/≤0.06 | ≤0.06/0.12 |

^a Las CMI se muestran en µg/ml.

1.1.1. Hábitat natural e importancia clínica.

La familia Enterobacteriaceae se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. Muchas especies de esta familia están reconocidas como importantes patógenos nosocomiales. Aunque con una menor prevalencia que otros miembros de Enterobacteriaceae, ciertas especies pertenecientes al género *Enterobacter* se están convirtiendo cada vez más en importantes patógenos nosocomiales (Tabla 1.2) (3). Ocupan entre el quinto y noveno lugar entre los agentes comunes de infecciones del torrente sanguíneo (8-10). En un estudio prospectivo de infecciones de heridas quirúrgicas, se observó que *Enterobacter* causa infección postoperatoria en el 100 % de

los casos cuando se aíslan estas especies durante la operación, mientras que *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus*, que se aíslan con una frecuencia tres veces mayor, causan infección con una probabilidad del 31 y el 35 % respectivamente (11). A pesar de que *E. cloacae* causa sepsis con menor frecuencia que microorganismos Gram-positivos, es dos veces más probable que cause mortalidad en los pacientes (12). *Enterobacter* spp. se encuentra también entre los organismos más comunes implicados en la recaída o re-infección en bacteriemias recurrentes (13). Se clasifica como el quinto, sexto y séptimo agente más común de infecciones del tracto urinario en América Latina, Europa y Norteamérica, respectivamente (14).

Tabla 1.2 Nomenclatura, fuente de aislamiento, y significado de las especies pertenecientes al género *Enterobacter* (4).

| Nomenclatura(previa) actual | Datos clínicos | | | Datos ambientales |
|---|----------------|-------------------------------|-------------|---|
| | Frecuencia | Fuente | Significado | |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | +++ | Todos los sitios | 1 | Agua, tierra, aguas residuales, animales, productos lácteos |
| <i>E. amnigenus</i> biogrupo 1 | - | | | Plantas |
| <i>E. amnigenus</i> biogrupo 2 | - | | | Agua |
| <i>E. asburiae</i> | ++ | TU, TR, heces, herida, sangre | 2 | Agua |
| <i>E. cancerogenus</i> (<i>E. taylorae</i>) | ++ | Herida, TR, heces | 2 | Animales, agua |
| <i>E. cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> | +++ | Todos los sitios | 1 | Agua, tierra, aguas fecales, carne |
| <i>E. cloacae</i> subsp. <i>Dissolvens</i> (<i>Enterobacter dissolvens</i>) | - | | | Tallo de cereal afectado |
| <i>E. cowanii</i> (<i>P. agglomerans</i> / Japanese NIH grupo 42) | NC | TU, TR, sangre, herida | 3 | NC |
| <i>E. gergoviae</i> | ++ | TR, TU, sangre | 2 | Agua, cosméticos |
| <i>E. hormaechei</i> subsp. <i>hormaechei</i> | ++ | TR, herida, sangre | 1 | NC, un aislamiento de una rana |
| <i>E. hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i> | ++ | Todos los sitios | 1 | Plantas |
| <i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i> | ++ | Todos los sitios | 1 | Plantas |
| <i>E. kobei</i> | NC | NC | NC | Comida |
| <i>E. ludwigii</i> (<i>E. cloacae</i>) | NC | TU, TR, sangre, heces | 2 | Comida |
| <i>E. nimipressuralis</i> (<i>Erwinia</i>) | - | | | Olmos afectados |
| <i>E. pyrinus</i> (<i>Erwinia</i>) | - | | | Perales afectados |
| <i>E. radicincitans</i> | - | | | Filósfera de trigo de invierno |
| <i>E. sakazakii</i> | ++ | TR, herida, CSF | 1 | NC |

Símbolos: +++, frecuente; ++, ocasional; ++ raro; + muy raro. 1, principales especies patógenos de humanos; 2, causa de enfermedad en raras ocasiones; 3, aislados de humanos con significado desconocido.

Sin embargo, la importancia del género *Enterobacter* como patógeno nosocomial se incrementa cuando se analizan los aislamientos procedentes de unidades de cuidados intensivos de forma independiente. Los datos ponen de manifiesto que *Enterobacter* se encuentra en tercer lugar dentro de los patógenos aislados con más frecuencia a partir de infecciones del tracto respiratorio (11,1 % de todos los aislamientos), ocupan el cuarto lugar en aislamientos obtenidos a partir de infecciones quirúrgicas (10,3 %) y el quinto lugar en aislamientos procedentes del tracto urinario (6,1 %) y sangre (5,3 %) (15). Aunque se pueden encontrar infecciones adquiridas en la comunidad provocadas por especies

de *Enterobacter*, la mayoría de las infecciones producidas por este microorganismo son nosocomiales (16, 17). La colonización y las infecciones nosocomiales producidas por *Enterobacter spp.* están asociadas frecuentemente con instrumentación y dispositivos médicos contaminados. Sin embargo, estas bacterias son ingeridas frecuentemente en la comida y las fuentes endógenas también deberían tomarse en consideración (4).

1.1.2. Factores de virulencia y patogénesis.

La capacidad de los miembros de la familia Enterobacteriaceae para causar infección es bastante variable. Abarca la flora comensal, que rara vez es patógena, patógenos oportunistas que pueden causar morbilidad y mortalidad considerable en hospedadores inmunocomprometidos, y los agentes patógenos capaces de iniciar la enfermedad en los individuos con óptimo sistema inmune.

E. cloacae ha estado implicado como agente etiológico de infecciones intestinales y extra-intestinales humanas que pueden causar bacteriemias graves, infecciones de piel y tejidos blandos, intra-abdominales, del tracto urinario y del sistema nervioso central, así como neumonías (4). Aunque *E. cloacae* es el patógeno nosocomial más común dentro del género *Enterobacter*, poco se conoce acerca de los factores que influyen en su patogenicidad y virulencia. El posible mecanismo de patogénesis es complejo y multifactorial, abarcando diferentes factores de virulencia cuyo papel en el desarrollo de la enfermedad no está demasiado claro.

Adhesinas.

La adhesión de las bacterias patógenas a las células del hospedador es un requisito indispensable para causar infección. Esta adhesión no es inespecífica, se produce a través de estructuras conocidas como adhesinas que unen selectivamente receptores afines de la superficie del hospedador para evitar la repulsión electrostática provocada por la carga negativa neta de ambos, hospedador y bacteria. Las Enterobacterias pueden producir varias adhesinas, como las fimbrias y proteínas de membrana externa. En algunos casos, los carbohidratos de superficie también pueden tener propiedades adhesivas (5). Las fimbrias de tipo I son las adhesinas mejor estudiadas. Se unen a receptores glucoproteicos que contienen manósidos presentes en las células del hospedador y, por tanto, la manosa inhibe esta unión. *E. cloacae* se adhiere a tejidos celulares y exhibe

hemaglutinación sensible a la manosa, probablemente como resultado de la expresión de fimbrias de tipo I (18).

Sistemas de secreción y toxinas.

Las toxinas fueron los primeros y, sin duda, siguen siendo los factores de virulencia mejor estudiados. Las toxinas son liberadas por bacterias al ambiente o directamente a las células del hospedador. Muchos miembros de la familia Enterobacteriaceae producen toxinas capaces de inducir la lisis de las células del hospedador. Ciertas cepas incluidas dentro del género *Enterobacter* producen enterotoxinas, α -hemolisinas y citotoxinas activadas por tiol (19).

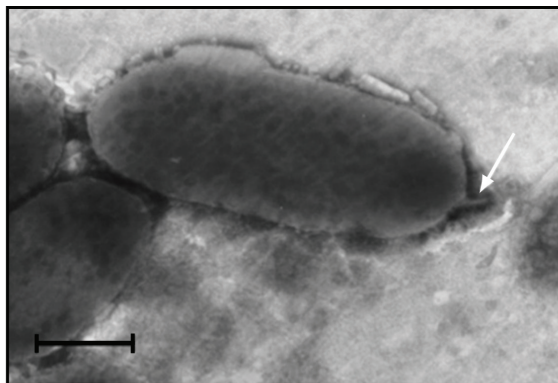


Figura 1.2 Imagen de *Enterobacter cloacae* con estructura en forma de aguja (señalada por la flecha) obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión (escala =200nm) (21).

Los fagocitos constituyen la primera línea de defensa innata del hospedador frente a las bacterias

patógenas al nivel de la barrera epitelial (20). Se ha demostrado que algunas cepas de *E. cloacae* son citotóxicas para los macrófagos al producir citotoxinas activadas por tiol capaces de suprimir la respuesta inmune del hospedador (21). También se ha aislado una nueva toxina activada por tiol de cepas de *E. cloacae* que ejerce un efecto sobre los eritrocitos y leucocitos. Una alta concentración de la toxina causa la lisis de los leucocitos antes de activar la apoptosis (19, 22). En varias bacterias Gram-negativas, el sistema de secreción tipo III (SSTT) es un factor importante que juega un papel crucial en las interacciones huésped-patógeno. El SSTT consiste en varias proteínas ensambladas en un sistema que inyecta factores de virulencia, por lo general toxinas, directamente en las células huésped. Las proteínas son transportadas a través de unas estructuras en forma de aguja conocidas como inyectosomas o simplemente agujas (Figura 1.2) (23). Por lo tanto, la presencia de SSTT se puede utilizar como un indicador general de la virulencia bacteriana (24). Hay siete familias de SSTT, de las cuales, SPI-1, SPI-2 y Ysc, han sido identificadas en bacterias de la familia Enterobacteriaceae (25).

Ciertas cepas de *E. cloacae* son portadoras del gen *ascV* que codifica una proteína implicada en SSTT en especies de *Aeromonas*. Por lo tanto los SSTT pueden contribuir a la patogénesis de *E. cloacae* (21).

Sideróforos.

Para diversas bacterias patógenas, el hierro es esencial para crecer, sobrevivir y sintetizar factores de virulencia. El contenido de hierro libre en los fluidos biológicos del hospedador es muy bajo, puesto que la mayor parte está unida a proteínas. Por ello, algunas bacterias expresan receptores de membrana para captar esas moléculas. Otras bacterias secretan sideróforos, que fijan hierro libre, y los complejos formados son captados por receptores bacterianos de membrana. Los genes que codifican receptores para captar hierro han sido considerados como marcadores de virulencia en estudios de epidemiología molecular.

En la familia Enterobacteriaceae los tres sistemas de sideróforos más frecuentes son la enterobactina, la aerobactina y la yersiniabactina. La enterobactina fue el primer sideróforo descrito, es un sideróforo tipo catecolato y lo producen más del 90 % de los aislamientos bacterianos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae (26-28). La aerobactina es un sideróforo tipo hidroxamato, lo producen algunas Enterobacteriaceae, y tiene menos afinidad por el hierro libre que la enterobactina o la yersiniabactina (29, 30). El tercer tipo es la yersiniabactina, descrito por primera vez en especies de *Yersinia* pero se encuentra también en otras especies. Se cree que se disemina por transferencia horizontal (31).

Bajo condiciones limitantes de hierro, *E. cloacae* produce dos sideróforos, enterobactina y aerobactina. En *E. aerogenes* y *E. coli* la síntesis de ambos sideróforos ocurre simultáneamente y sincronizadamente con el crecimiento. En *E. cloacae*, la enterobactina sólo se sintetiza en la fase logarítmica durante el crecimiento, mientras que la aerobactina se sintetiza en la fase logarítmica tardía y la fase estacionaria. También se observa una producción diferente de enterobactina y aerobactina en función de la cantidad de hierro disponible. *E. cloacae* produce enterobactina preferentemente bajo condiciones limitantes de hierro, mientras que la producción de aerobactina es máxima bajo condiciones deficientes en hierro (32).

1.1.3. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos.

Enterobacter spp. ha sido reconocido como importante patógeno nosocomial en los últimos años. La mayoría de estos organismos son innatamente resistentes a viejos agentes antimicrobianos y tienen la capacidad de desarrollar rápidamente resistencia a los nuevos agentes. Está bien establecido que las cepas de *Enterobacter* rápidamente pueden desarrollar resistencia a múltiples antibióticos β -lactámicos durante el tratamiento (7, 33). Su prevalencia como patógenos nosocomiales ha aumentado en general, mientras que las cepas multirresistentes han emergido en áreas del hospital donde el uso de cefalosporinas es elevado. En general, la prevalencia de resistencia a los antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos, trimetoprim-sulfametoxazol, y quinolonas se ha incrementado con el tiempo, y esto está asociado a un mayor uso de los fármacos en un entorno determinado (3).

Hay tres mecanismos principales a través de los cuales estos patógenos pueden volverse resistentes a un agente antimicrobiano (Figura 1.3). Estos incluyen la producción de enzimas inactivadores de antibióticos, la alteración de la diana del antimicrobiano y la disminución de la concentración de la droga en el interior de la célula mediante el control de la permeabilidad de membrana. El primer mecanismo está implicado frecuentemente en la resistencia de *Enterobacter* spp. a los antibióticos β -lactámicos y aminoglucósidos, mientras que los dos últimos están implicados en la resistencia a las quinolonas y trimetoprim-sulfametoxazol con mayor frecuencia (3).

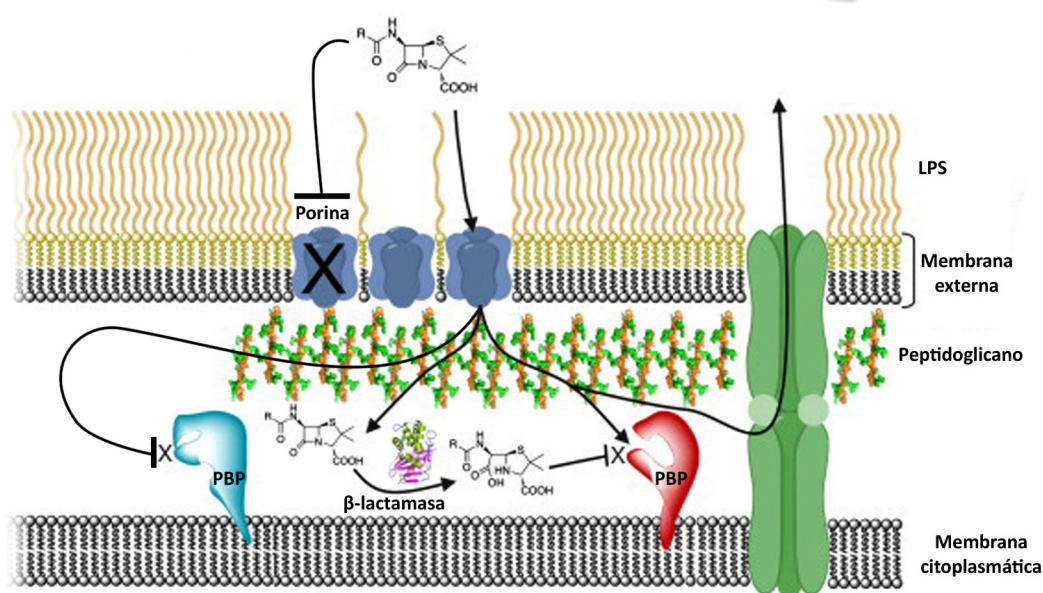


Figura 1.3 Representación esquemática de los mecanismos de resistencia presentes en bacterias Gram-negativas. Figura modificada a partir de la referencia (34).

1.1.3.1. Producción de enzimas inactivadores de antibióticos.

El principal mecanismo de resistencia a los antibióticos β -lactámicos consiste en la expresión de β -lactamasas. Los antibióticos β -lactámicos, entre los que destacan las penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas y monobactam, se caracterizan por poseer dos anillos fusionados (excepto el monobactam), los cuales les proporcionan su actividad biológica: el anillo β -lactámico y el anillo dihidrotiazínico. Su actividad bactericida se produce mediante la destrucción de la estructura de la pared celular del microorganismo. Las β -lactamasas son enzimas de carácter proteico, codificadas a través de la expresión de un gen cromosómico, aunque pueden estar codificadas en plásmidos o diseminarse a través de transposones. Pueden expresarse de manera inducible o constitutiva y son capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico dejándolo inactivo. Probablemente estas enzimas se han desarrollado como variantes de las propias enzimas biosintéticas de la pared celular: las transpeptidasas, transglicosidasas y carboxipeptidasas, que se conocen como las proteínas fijadoras de penicilinas (PBPs), las cuales son objeto del ataque de los β -lactámicos. Las β -lactamasas se clasifican de diversas formas: por la secuencia de sus aminoácidos, por su espectro de actividad, su peso molecular, su especificidad de sustrato y por su origen cromosómico o plasmídico. En 1980 Ambler clasifica las enzimas en cuatro clases según su estructura molecular: A, B, C y D (35).

β -lactamasas de clase A.

Las β -lactamasas de clase A, junto con las de clase C y D son enzimas serina-dependientes ya que presentan una serina en el sitio activo necesaria para catalizar la hidrólisis antibiótica. En este proceso se cataliza un acil-intermediario uniéndose la serina del centro activo al anillo del antibiótico y haciéndolo así inactivo.

Las β -Lactamasas de Espectro Extendido (BLEEs) son enzimas diseminadas mayoritariamente vía plasmídica que hidrolizan los antibióticos β -lactámicos incluyendo los que contienen el grupo oxi-imino, como las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, y el aztreonam. Respecto a la presencia de BLEEs, *E. aerogenes* portador de TEM-24, se ha diseminado en Francia, Italia, España, Bélgica y Portugal en forma de brotes epidémicos (36, 37). En un estudio realizado en Estados Unidos sobre *Enterobacter* aislados de hemocultivos, 15 de 45 aislamientos poseían una BLEE tipo SHV (SHV-2, -5, -7, -12, -14, -30), además de AmpC, no existiendo relación clonal entre las cepas (38). SHV-12

se ha encontrado en *E. cloacae* también en otros países como Taiwán (39). En un estudio de 12 años realizado en un hospital de nuestro país, CTXM-10 fue predominante en *E. cloacae*, y se encontraron cinco clones diferentes entre los diez aislamientos detectados (36). En Portugal, en un estudio de prevalencia de BLEEs en *Enterobacterias* de origen clínico, encontraron en *E. cloacae* las enzimas TEM-10 y SHV-12 y en *E. aerogenes* las enzimas TEM-24 y TEM-116 (40). En nuestro país, recientemente y de manera específica en nuestro hospital, se ha descrito un brote epidémico hospitalario causado por una cepa de *E. cloacae* productora de SFO-1, codificada en un plásmido; es la primera vez que se detecta esta enzima fuera de Japón (41).

β-lactamasas de clase B (metalo-β-lactamasas).

Las enzimas de este grupo se diferencian de las de los demás grupos por no ser enzimas serina-dependientes, requiriendo la presencia de iones metálicos (Zn^{+2}) para la ruptura del anillo β-lactámico (42). Son quizás la clase menos frecuente en clínica, pero como ocurre con el resto de β-lactamasas, se aíslan cada vez con mayor frecuencia. Y, además, tienen una especial relevancia porque junto con las carbapenemasas de clase D tipo OXA y otras carbapenemasas de clase A, pueden conferir resistencia a los antibióticos carbapenémicos. La resistencia a carbapenémicos en aislamientos clínicos de *E. cloacae* es inusual. Se han descrito aislamientos clínicos de *E. cloacae* productores de metalo-β-lactamasas en diferentes áreas geográficas (43-46), presentando una reducción en la sensibilidad a carbapenemas.

β-lactamasas de clase C.

En general las β-lactamasas de clase C son enzimas cefalosporinasas, con un perfil hidrolítico mayor sobre cefalosporinas que sobre penicilinas y, además, no son inhibidos por ácido clavulánico. La mayoría de las bacterias Gram-negativas portan en el cromosoma un gen *ampC* que expresan de manera inducible, y en algunas ocasiones de manera constitutiva. Estas enzimas fueron originariamente cromosómicas pero han saltado a plásmidos y se han ido diseminando entre diferentes especies por transmisión horizontal vía plasmídica, probablemente debido al uso de 7-α-metoxicefalosporinas y a la introducción en la práctica clínica de las combinaciones de β-lactámicos junto con inhibidores de β-lactamasas (47).

Enterobacter es intrínsecamente resistente a ampicilina y cefalosporinas de primera y segunda generación como resultado de la expresión de la β -lactamasa cromosómica inducible *ampC*. Además, estas β -lactamasas de clase C, pueden conferir resistencia constitutiva a las oximiino-cefalosporinas si son hiperproducidas como consecuencia de una desrepresión mutacional (48). En este sentido, también se ha demostrado que la hiperexpresión de la β -lactamasa cromosómica AmpC se puede producir como consecuencia de la inactivación de PBPs (49).

β -lactamasas de clase D.

De manera histórica, se han denominado a las β -lactamasas de clase D como oxacilinasas porque las primeras que se describieron hidrolizaban con mayor facilidad oxacilina que las penicilinas clásicas. A ello se debe la designación de OXA para las enzimas de clase D. Además hidrolizan amoxicilina, meticilina, cefaloridina y algunas con espectro extendido. Por el contrario, la actividad carbapenemasa parece ser una propiedad intrínseca de algunas oxacilinasas. Este tipo de β -lactamasas se encuentran principalmente en *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, aunque se han identificado OXA-23 y OXA-48 en la familia Enterobacteriaceae (50, 51).

Como en otros miembros de la familia Enterobacteriaceae, la resistencia a antibióticos aminoglucósidos de cepas pertenecientes al género *Enterobacter* es debida a la producción de una o más enzimas inactivadores de aminoglucósidos, como AAC (3)-II, AAC (3)-III, AAC (3)-I y AAC (3)-V (3).

1.1.3.2. Alteración de la diana del antimicrobiano.

Otro mecanismo de resistencia asociado a los β -lactámicos es la alteración de las proteínas PBPs. Estas proteínas se han denominado así por ser las dianas de las penicilinas, siendo indispensables para la formación e integridad de la pared. La unión de los antimicrobianos a las PBPs causa inhibición del crecimiento bacteriano, inhibición de la división celular y pérdida de la biosíntesis de muropéptidos de pared celular causando lisis celular (52). La resistencia a quinolonas de bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae obedece, entre otros mecanismos, a la modificación por mutación de los genes de *gyrA* y *gyrB* que codifican las topoisomerasas II y IV, respectivamente, inhibiendo así la síntesis de ADN en la bacteria (4).

La resistencia a rifampicina se presenta cuando cambios en la subunidad de la ARN polimerasa codificada por el gen *rpoB* alteran la unión del antibiótico a la misma, impidiendo así la acción del antibiótico. Este mecanismo de resistencia es común en Enterobacterias (4).

1.1.3.3. Control de la permeabilidad de membrana: expresión de porinas de membrana externa y bombas de expulsión.

En Enterobacteriaceae, la permeabilidad de membrana es un elemento clave en el nivel de sensibilidad a los antibióticos. Las bacterias Gram-negativas, como *E. cloacae* se encuentran rodeadas de la membrana externa, cuya principal función consiste en servir de barrera selectiva para la entrada y salida de sustancias. La membrana externa está formada por una bicapa lipídica con poca afinidad por sustratos hidrofílicos, como pueden ser los nutrientes. Por ello, necesitan la presencia de ciertas proteínas de membrana externa (OMPs) denominadas porinas, cuya función es la de permitir el paso de productos hacia el interior de la célula. La modificación de la envuelta bacteriana por reducción en la producción de porinas o incremento en la expresión de sistemas de expulsión está ampliamente estudiada en Enterobacteriaceae. Este fenómeno está asociado frecuentemente con otros mecanismos de resistencia dando lugar a fenotipos MDR en diferentes cepas bacterianas. En *Enterobacter*, y otros miembros de la familia Enterobacteriaceae, varios genes y factores externos están implicados en la emergencia de aislamientos con fenotipo MDR. Estos aislamientos muestran una reducción significativa de porinas funcionales, debido a la disminución, ausencia completa, o producción de la proteína alterada, o una hiperexpresión de sistemas de expulsión. La acción combinada de estos mecanismos durante la infección confiere una disminución significativa en la sensibilidad a antibióticos, garantizando la diseminación y colonización del paciente y favoreciendo la adquisición de mecanismos de resistencia adicionales. Mutaciones en diferentes genes reguladores están implicadas en el control de la permeabilidad de membrana al inducir la expresión de sistemas de expulsión y disminuir la expresión de porinas, participando activamente en la aparición de un fenotipo MDR (53).

1.2. Bombas de expulsión.

Las bombas de expulsión son proteínas transportadoras implicadas en la extrusión de compuestos tóxicos (incluidas todas las clases de antibióticos clínicamente relevantes) del interior al exterior celular. Estas proteínas se encuentran tanto en bacterias Gram-negativas como en Gram-positivas, así como en organismos eucariotas (54). Pueden ser específicas de sustrato o transportar un amplio rango de compuestos estructuralmente no relacionados.

Las bombas de expulsión como mecanismo de resistencia fueron descritas por primera vez en 1980 (55, 56) donde se demostró la presencia de un plásmido portador de un gen que codifica una bomba de expulsión de tetraciclina. Se suponía que estos mecanismos de resistencia a antibióticos eran adquiridos probablemente mediante transferencia horizontal desde organismos productores de tetraciclina, por lo que se asemeja a los mecanismos de resistencia a antibióticos clásicos (57-59). Sin embargo, pronto se hizo evidente que los sistemas de expulsión no estaban exclusivamente codificados en plásmidos ni eran específicos para un determinado antibiótico (60, 61). Los genes que codifican estos elementos se encuentran en el cromosoma de otros procariotas y también en los cromosomas de arqueas y eucariotas (62-66). Por ejemplo, se estableció un papel relevante en la resistencia de las células tumorales a la quimioterapia para la P-glicoproteína, que previamente se había demostrado estar implicada en la resistencia a la colchicina (67, 68). Con los años, se ha demostrado en diferentes estudios la contribución de los sistemas de expulsión en la resistencia antibiótica en patógenos bacterianos relevantes (69).

Las bombas de expulsión difieren de los mecanismos de resistencia antibiótica clásicos en muchos aspectos. Como se mencionó anteriormente, la suposición general es que los genes de resistencia a antibióticos se habían originado en organismos productores de antibióticos (57, 70) y que estos genes se extendieron a otras bacterias a través de transferencia horizontal como resultado de la presión selectiva ejercida por el uso intensivo de antibióticos (59, 70-72). Por el contrario, ahora se sabe que la presencia de bombas de expulsión no se limita a los productores de los antibióticos. En el caso de las bacterias, la mayoría de los genes que codifican las bombas de expulsión multidroga analizados hasta el momento se encuentran en el cromosoma y presentan una disposición

y estructura conservada, y su expresión está estrictamente regulada (53).

Además, todas las cepas de una especie dada llevan los mismos genes conservados que codifican estos sistemas de expulsión en su cromosoma (73). La incidencia de estas bacterias no se limita a entornos con una carga alta de antibióticos. De hecho, los organismos con el mayor número de bombas se encuentran en el suelo o en asociación con las plantas (74), lo que sugiere que estos genes codificados cromosómicamente no fueron adquiridos recientemente por bacterias patógenas en respuesta a la terapia antibiótica, sino que se trata de elementos evolutivamente antiguos de gran importancia para la fisiología y el comportamiento ecológico de todos los seres vivos, incluyendo las bacterias.

Dada la relevancia clínica de los sistemas de expulsión, deben ser considerados a la hora de formular nuevas estrategias para tratar las infecciones provocadas por microorganismos multirresistentes, desarrollando nuevos agentes capaces de evadir estos sistemas o sintetizando nuevos fármacos que inhiban específicamente su función.

1.2.1. Clasificación de las bombas de expulsión.

La genómica ha revelado que existen muchos genes que codifican diferentes tipos de bombas de expulsión, entre los cuales existe un grupo en concreto implicado en multirresistencia (75). También hay evidencias de que el tamaño del genoma está

relacionado con el número de genes que codifican bombas de expulsión, de tal manera que grandes genomas poseen un mayor número de genes implicados (63, 76).

Las bombas de expulsión activa, sea cual sea su sustrato, se clasifican en diferentes familias que difieren en el modo de obtener energía para su actividad, en su organización, y en los sustratos que pueden eliminar (77). Hay cinco familias de bombas de expulsión activa asociadas con multirresistencia: ABC (*ATP-binding cassette*), MFS (*major facilitator superfamily*), MATE (*multidrug and toxic-compound extrusion*), SMR (*small multidrug resistance*) y RND (*resistance nodulation division*) (Figura 1.4). Un único organismo puede expresar bombas de expulsión de más de una familia y/o más de un tipo de bomba perteneciente a la misma familia (78).

Transportadores ABC.

Los transportadores ABC están presentes en todas las células de todos los organismos y usan energía

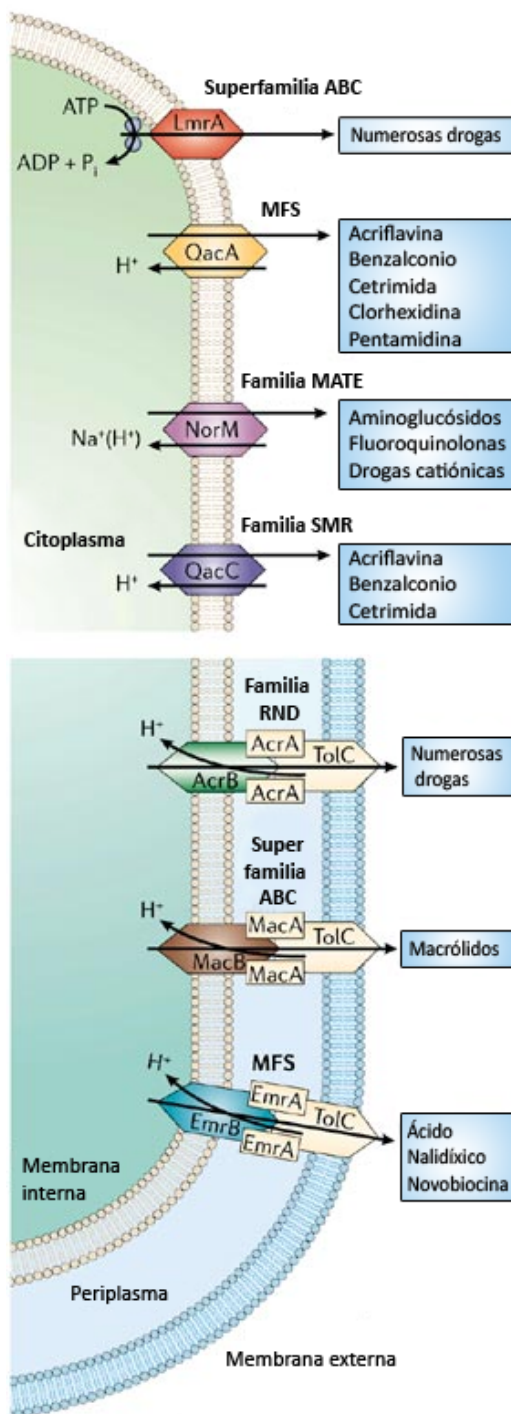


Figura 1.4 Representación esquemática de las diferentes familias de sistemas de expulsión activa (78).

procedente de la unión y posterior hidrólisis de ATP para transportar el sustrato a través de la membrana (79). Por lo general, son específicos para un sustrato concreto, que puede ser iones inorgánicos, aminoácidos, azúcares, polipéptidos o cualquier otra clase de moléculas. Sin embargo, unos pocos transportadores ABC han desarrollado una amplia especificidad por moléculas de carácter hidrofóbico.

Los transportadores multidroga pertenecientes a la familia ABC están implicados en resistencia antibiótica, en resistencia a fármacos en hongos y protozoos y en resistencia a herbicidas en plantas.

La unidad mínima funcional de todos los transportadores ABC se compone de cuatro dominios (80); dos dominios citoplasmáticos de unión a nucleótidos (NBDs), que unen e hidrolizan ATP y dos dominios transmembrana (TMDs) que se componen cada uno de varias hélices α que atraviesan la membrana y forman una vía a través de la cual los sustratos cruzan la membrana. Estos cuatro dominios se pueden fusionar en polipéptidos de varias maneras. A diferencia de los transportadores RND, MFS y MATE, las bombas de expulsión ABC obtienen energía a partir de la hidrólisis de ATP. La unión de ATP induce la formación de un dímero cerrado con dos moléculas de ATP intercaladas en la interfaz del dímero, al producirse una rotación de cada NBD con respecto al otro. La hidrólisis del ATP devuelve el dímero a su conformación abierta. La unión de ATP por parte de los NBDs y la formación del dímero cerrado induce cambios conformacionales importantes en los TMDs (81, 82) que intervienen en la translocación del sustrato, en una reducción en la afinidad de unión a la droga (83-86) y en la reorientación del lugar de unión para que sea expuesto a la cara extracelular de la membrana y así las drogas puedan ser liberadas.

Transportadores MFS.

Los transportadores MFS y los ABC son las dos familias de transportadores más grandes y más diversas desde el punto de vista funcional. Sin embargo, los transportadores MFS se diferencian de los ABC tanto en su secuencia y estructura como en la manera de obtener energía para realizar su función. Éstos obtienen la energía necesaria para el transporte del gradiente electroquímico de protones.

En bacterias Gram-positivas clínicamente relevantes, las dos bombas de expulsión que

han sido estudiadas con más detalle pertenecen a la familia MFS: NorA de *Staphylococcus aureus* y PmrA de *Streptococcus pneumoniae*.

La estructura de un transportador multidroga de esta superfamilia, EmrD de *E. coli*, se ha determinado a 3,5 Å de resolución (87). EmrD expulsa una gran variedad de moléculas citotóxicas de la célula y es homóloga a otros dos transportadores MFS que se han caracterizado bioquímicamente en detalle: LmrP de *Lactococcus lactis* y MdfA de *E. coli*. EmrD es una proteína compacta con doce hélices α que atraviesan la membrana organizadas en dos haces de seis, que forman una cavidad hidrofóbica en la bicapa lipídica. Las hélices α más internas se disponen formando una amplia cavidad, lo cual le otorga a EmrD una amplia especificidad de sustrato.

Transportadores MATE.

Las bombas de expulsión multidroga pertenecientes a la familia MATE han sido descritas en varias bacterias, como *Vibrio parahaemolyticus* (NorM), *Vibrio cholerae* (VcrM; VcmA), *Bacteroides thetaiotaomicron* (BexA), *Haemophilus influenzae* (HmrM), *P. aeruginosa* (PmpM), *Clostridium difficile* (CdeA), y *S. aureus* (MepA). Estas proteínas utilizan dos fuentes de energía para llevar a cabo el transporte. Además de utilizar el gradiente electroquímico de protones también usan un gradiente de sodio. Estos transportadores son capaces de reconocer y expulsar algunos compuestos que son sustratos de transportadores RND. Sin embargo, difieren en la organización estructural, pues los transportadores MATE están formados por una proteína y los RND son un complejo de tres proteínas (88).

Transportadores SMR.

Las proteínas SMR son una pequeña familia de transportadores restringidos a las células procariotas. Son también los transportadores multidroga más pequeños, con sólo cuatro hélices transmembrana y un dominio extramembrana, aunque, como funcionan como dímeros, se trata finalmente de un conjunto funcional de ocho hélices. El transportador SMR mejor estudiado es EmrE de *E. coli*, que puede conferir resistencia a una amplia variedad de moléculas catiónicas hidrofóbicas, incluyendo antibióticos (89). EmrE es, en esencia, un haz de ocho hélices transmembrana, que forma una vía a través de la membrana. Esta vía está cubierta principalmente por aminoácidos hidrofóbicos y

aromáticos de varias de las hélices α y es potencialmente accesible desde ambas caras de la membrana.

Transportadores RND.

Los transportadores RND están especialmente diseminados entre las bacterias Gram-negativas y juegan un papel importante en la resistencia intrínseca de estas bacterias al catalizar la expulsión activa de muchos antibióticos y agentes terapéuticos. Poseen dominios periplasmáticos muy grandes y forman un complejo proteico junto con canales de membrana externa y proteínas periplasmáticas adaptadoras. La organización genética de los genes que codifican estas tres proteínas que forman el sistema de expulsión es similar en las diferentes especies. Por lo general, los genes están organizados en un operón. El gen regulador está situado adyacente al gen que codifica la proteína accesoria periplasmática, que está adyacente al gen que codifica la proteína transportadora, que se encuentra junto al gen que codifica la proteína de membrana externa. La proteína de fusión a membrana y la proteína transportadora normalmente son co-transcritas. En algunas especies, el gen que codifica la proteína de membrana externa no está co-localizado con los otros dos genes, por ejemplo, *acrAB* y *tolC*, de *E. coli* (90), y *mexXY* y *orpM*, de *P. aeruginosa* (91).

La organización de este complejo permite a la bacteria expulsar la droga directamente del interior al exterior celular (92), lo que supone una gran ventaja para las células bacterianas, ya que una vez expulsada al espacio exterior, la droga debe atravesar la membrana externa, caracterizada por su baja permeabilidad, para volver a entrar en las células, a diferencia de las moléculas localizadas en el periplasma, que pueden difundir fácilmente a través de la membrana interna altamente permeable. Así, este sistema de expulsión genera resistencia antibiótica de manera muy efectiva trabajando sinérgicamente con la barrera que supone la membrana externa bacteriana (62, 93).

Las bacterias Gram-negativas son resistentes a la mayoría de antibióticos lipofílicos. Se pensaba que esta resistencia intrínseca era debida a la exclusión de las drogas por la barrera de membrana externa. De hecho, superar la barrera que supone la membrana externa hace sensibles a las células de *E. coli* a los antibióticos anteriormente mencionados (94). Sin embargo, la inactivación del principal transportador RND (AcrB) hace que las bacterias sean casi completamente sensibles a estos compuestos (95), inclusive con la

membrana externa intacta. Así, la resistencia intrínseca característica de las bacterias Gram-negativas se debe tanto a las bombas de expulsión pertenecientes a la familia RND como a la barrera que supone la membrana externa.

1.2.2 Transportadores RND: AcrAB-TolC.

Dentro de los transportadores pertenecientes a la familia RND, la bomba de expulsión AcrAB-TolC de *E. coli* es una de las más estudiadas. Confiere resistencia a una amplia variedad de compuestos tóxicos, y su implicación en multirresistencia ha sido ampliamente demostrada dentro de la familia Enterobacteriaceae (96-104). Este sistema de expulsión está formado por tres proteínas: una proteína transportadora, AcrB, localizada en la membrana interna (citoplasmática) de la bacteria; una proteína accesoria (perteneciente a la familia MFP, proteínas de fusión a membrana), AcrA, localizada en el espacio periplasmático y una proteína de membrana externa (perteneciente a la familia OMF, factor de membrana externa), TolC, que está localizada en la membrana externa de la bacteria. Se piensa que la proteína transportadora AcrB, similar a AcrD (105), captura el sustrato bien desde la bicapa lipídica o bien desde el citoplasma y lo transporta al medio extracelular a través de TolC, que forma un canal en la membrana externa (106). La cooperación entre AcrB y TolC está mediada por la proteína accesoria periplasmática AcrA.

En la familia Enterobacteriaceae, TolC, puede actuar como proteína canal de diferentes bombas de expulsión pertenecientes a la familia RND y puede también interactuar con transportadores MFS (por ejemplo EmrAB de *E. coli*) y ABC (por ejemplo MacAB de *E. coli*) (78).

1.2.2.1. Estructura de AcrAB-TolC.

Parte importante del conocimiento acerca de los sistemas de expulsión RND viene de la cristalografía. Murakami y colaboradores han resuelto la estructura de AcrB como un homotrímero (107) (Figura 1.5). Tres Monómeros idénticos de AcrB forman un complejo proteico en la membrana citoplasmática. Cada monómero tiene un dominio compuesto por 12 hélices transmembrana, y un gran dominio periplasmático plegado de una forma compleja para dar lugar al poro (109, 110). Los monómeros presentan tres conformaciones posibles y los cambios cíclicos de estas conformaciones son los

responsables del mecanismo de bombeo de AcrB (109-112). La inactivación de cualquier monómero suprime la actividad de todo el complejo, confirmando que la unidad funcional básica de AcrB es un trímero (113). Tres residuos aminoacídicos cargados (Asp407, Asp408 y Lys940) localizados en el dominio transmembrana y que están conservados en los transportadores RND y son esenciales para su función (107), probablemente intervengan en el movimiento de protones.

El dominio periplasmático es parcialmente responsable de la especificidad de sustrato (114, 115). Estudios en los que este dominio de AcrB de *E. coli* era reemplazado por el de AcrD, mostraron cómo la especificidad de sustrato de la proteína quimérica cambiaba, parecía la de AcrD y no la de AcrB (116, 117).

El sitio de unión a sustrato es rico en residuos aromáticos, especialmente fenilalanina, que interactúa con gran variedad de sustratos estructuralmente no relacionados (109, 110). Se han usado técnicas de mutagénesis dirigida que han demostrado que la mutación de diferentes residuos de fenilalanina del sitio de unión tiene efectos diferentes en la sensibilidad a sustratos y que el residuo Phe610 tiene un impacto particularmente significativo y amplio sobre la sensibilidad (118). Por el contrario, una sustitución en el residuo 616 resultó ser particularmente relevante para la resistencia a macrólidos (119) y una sustitución en la Ser715 tuvo un efecto específico sobre la resistencia a ácidos biliares (118). Algunos sustratos todavía son alojados en un sitio de unión mutado, mientras que otros más grandes, como los macrólidos, no son capaces de adaptarse a cambios provocados por una simple sustitución (118).

La proteína adaptadora AcrA muestra una forma muy alargada (Figura 1.7). Esta forma resulta de la unión de diferentes dominios: un dominio de hélices α en forma de horquilla alargada en la parte superior de otro dominio alargado, el *lipoyl*, que por lo general

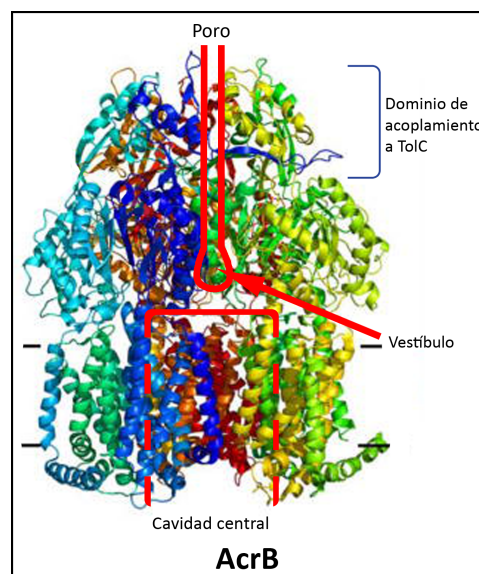


Figura 1.5. Estructura del transportador de membrana interna AcrB modificada a partir de la referencia (108).

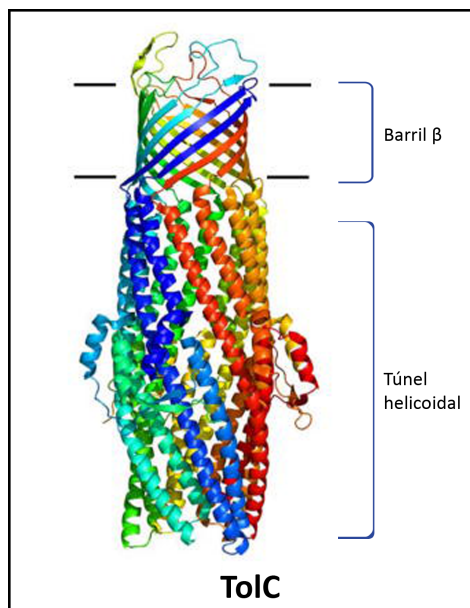


Figura 1.6. Estructura de la proteína de membrana externa TolC. Modificada a partir de la referencia (108).

lleva unido ácido lipoico y un dominio barril β (120-122). La estructura del cuarto dominio situado en el extremo opuesto del la horquilla de hélices α , llamado dominio de membrana proximal (MP), se resolvió recientemente (123). Todos estos dominios separados crean una estructura flexible. Esta flexibilidad viene dada de la articulación entre el dominio *lipoyl*, la horquilla de hélices α y el dominio barril β .

La estructura de TolC (124) (Figura 1.6) muestra que es un trímero donde cada protómero tiene un dominio barril de 40 Å de longitud anclado a la membrana externa y un dominio de hélices

α de 100 Å de longitud formado por doce cordones que se extienden profundamente dentro del periplasma formando un túnel.

Estas estructuras sugieren que la punta del dominio periplasmático de AcrB, o dominio de acoplamiento a TolC, interactúa con el final del túnel periplasmático de TolC. Se confirmó este contacto introduciendo residuos de cisteína en la parte superior de AcrB y en la inferior del canal TolC, observando la formación de enlaces disulfuro (125).

Con respecto a la interacción de AcrA y AcrB (Figura 1.7) se ha visto que la proteína adaptadora AcrA no puede ser reemplazada por otra de la misma condición, YhiU, después de analizar diferentes moléculas quimera de AcrA que contenían diferentes regiones de YhiU (126). De los 398 residuos de la secuencia de AcrA, los 290 primeros podrían ser sustituidos, sin embargo, cualquier sustitución de los residuos comprendidos desde el 290 al 357 genera una proteína inactiva incapaz de formar parte del complejo con AcrB, sugiriendo que la porción C-terminal de la proteína adaptadora es importante para la interacción con la proteína transportadora.

Con respecto a la interacción entre AcrA y TolC, Koronakis y colaboradores (127) fueron capaces de llevar a cabo un análisis fino de la resolución por el entrecruzamiento de los residuos Cys de AcrA, introducidos por mutagénesis dirigida, con grupos amino en la superficie de TolC, estableciendo cómo un solo lado de la horquilla de hélices α en AcrA

interactúa fuertemente con el surco intramolecular en el túnel helicoidal de TolC.

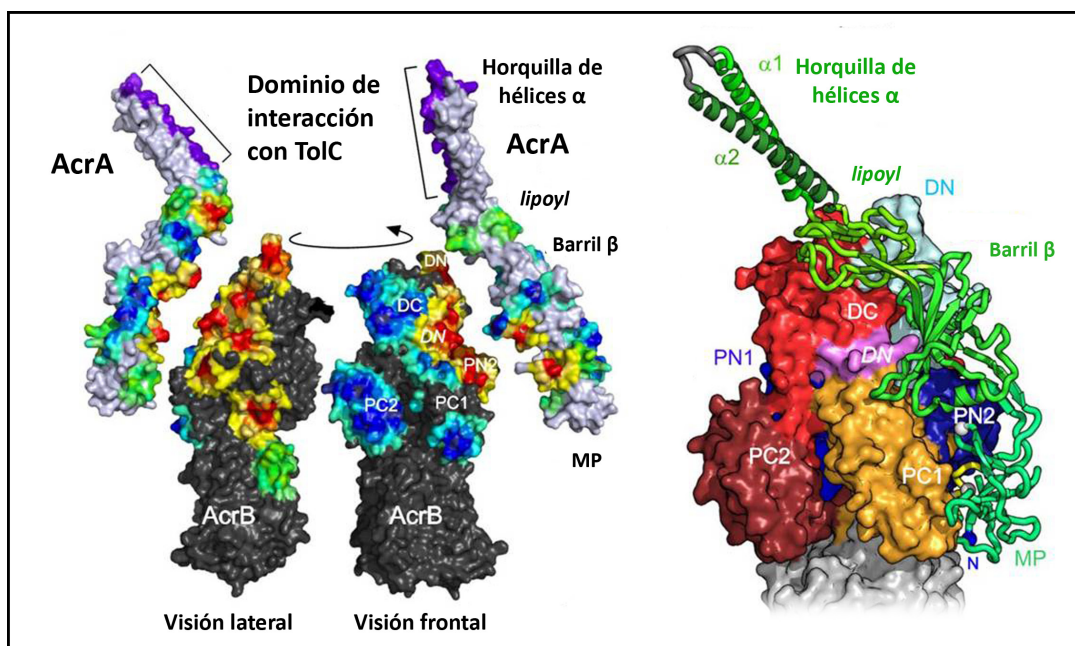


Figura 1.7. Interacción entre la proteína de fusión a membrana AcrA y el transportador de membrana interna AcrB (123).

1.2.2.2. Sustratos de bombas de expulsión.

La comparación de CMI entre cepas salvajes y cepas defectivas en los genes *acrA* y *acrB* (Δ *acrAB*) (90, 92, 128) mostró que AcrB de *E. coli* puede reconocer un rango muy amplio de compuestos. Estos incluyen colorantes catiónicos como la acriflavina, cristal violeta, bromuro de etidio y rodamina 6G; antibióticos como las penicilinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas, macrólidos, cloranfenicol, tetraciclinas, novobiocina, ácido fusídico, oxazolidinonas, y rifampicina; detergentes como el triton X-100, SDS (*sodium dodecylsulfate*), ácidos biliares e incluso simples solventes orgánicos como pentano o ciclohexano (129, 130). Es obvio que no existe una similitud desde el punto de vista estructural entre la mayoría de estos compuestos. Además los estados de carga de los ligandos son diversos, algunos son no iónicos, algunos son aniónicos, algunos catiónicos y otros contienen múltiples grupos ionizables (Figura 1.8). Sin embargo, estos sustratos poseen una característica común; son todos ellos relativamente lipofílicos (92).

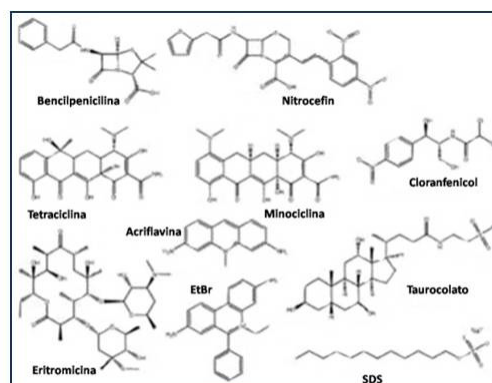


Figura 1.8. Sustratos de la bomba de expulsión AcrAB-TolC (108).

Esto apoya la hipótesis de que estos sustratos interactúan en primer lugar con la membrana de la bicapa lipídica (92), y son capturados ya sea desde el interior de la bicapa o desde la interfase bicapa-fase acuosa. Sin embargo, ahora que se conoce la estructura de AcrB, se pueden interpretar esas observaciones de un modo diferente, como el resultado de la interacción entre el sustrato y el interior hidrofóbico del sitio de unión a sustrato de AcrB.

La especificidad de sustrato extremadamente amplia que tienen este tipo de sistemas hace que las bacterias que carecen de ellos sean hipersensibles no sólo a diversos colorantes, detergentes y desinfectantes, sino a un amplio rango de antibióticos relevantes en la práctica clínica.

1.2.3. Regulación de la expresión de las bombas de expulsión: control de la expresión del operón *acrAB*.

En las bacterias Gram-negativas, las bombas de expulsión pertenecientes a la familia RND son especialmente eficaces generando resistencia a múltiples familias de antibióticos. El rango de sustratos para muchas bombas de expulsión multidroga se solapa y es curioso observar que las bacterias, con sus genomas económicamente organizados, son portadoras de un gran conjunto de genes que codifican bombas de expulsión (92). La clave para entender cómo las bacterias utilizan estos sistemas se encuentra en la regulación de su expresión (53).

Los datos disponibles actualmente indican que las bombas de expulsión multidroga se expresan a menudo bajo un control transcripcional preciso y elaborado (53).

Aunque ha habido muchos estudios sobre los mecanismos de regulación de las bombas de expulsión en mutantes obtenidos en el laboratorio, los mecanismos que dan lugar a un aumento de la expulsión de compuestos tóxicos en aislamientos clínicos se pueden clasificar en cuatro grupos: 1) mutaciones en el gen regulador a nivel local que reprime la expresión de la bomba de expulsión, 2) mutaciones en genes que codifican reguladores globales, 3) mutaciones en la región promotora de los genes que codifican las proteínas que forman parte de los sistemas de expulsión, y 4) inserción de elementos en la región upstream de los genes que codifican las proteínas transportadoras.

Como se mencionó anteriormente, el sistema de expulsión AcrAB-TolC es muy efectivo generando resistencia a una amplia variedad de sustratos específicos. La expresión del

operón *acrAB* está sujeta a diferentes niveles de regulación (Figura 1.9). Su expresión está modulada localmente por el represor AcrR (131) y, a un nivel más global, está regulada por las diferentes condiciones de estrés y por proteínas reguladoras como MarA, SoxS, RobA y RamA (130, 132-137).

acrA y *acrB* son co-transcritos bajo el control de AcrR. Este represor posee un dominio de unión a ADN HTH (*helix-turn-helix*) que lo sitúa dentro de la familia de represores TetR, junto con otros reguladores como MtrR de *Neisseria gonorrhoeae*, QacR de *S. aureus* y AcrS, una proteína que controla la expresión del sistema de expulsión AcrEF (138, 139), homóloga a AcrAB presente en *E. coli*.

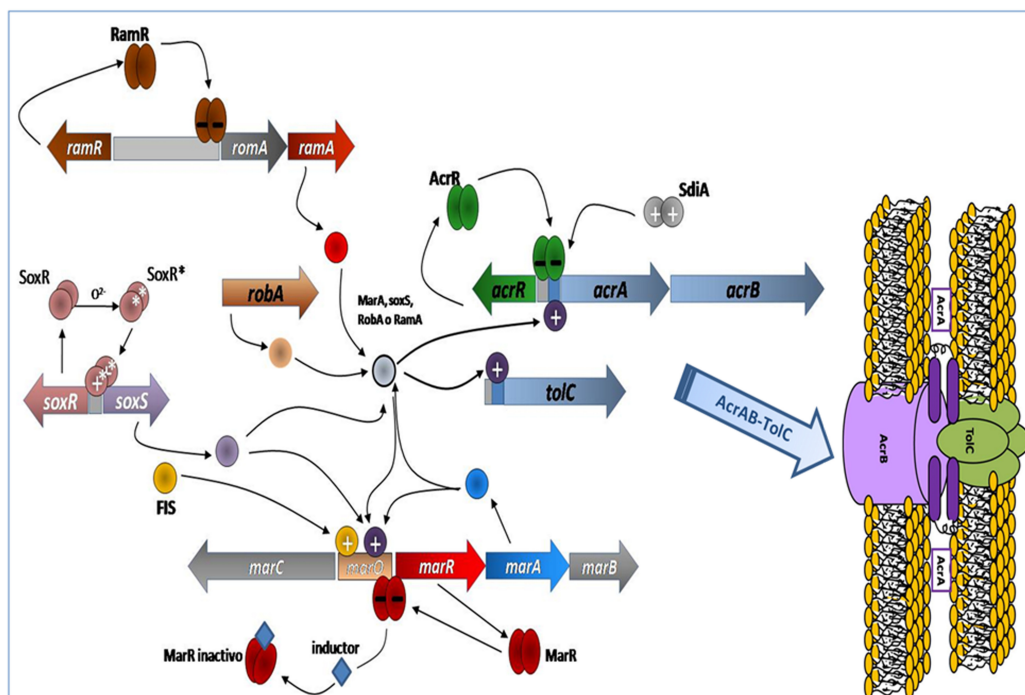


Figura 1.9. Representación esquemática de los mecanismos de regulación de bomba de expulsión AcrAB-TolC.

La función principal de AcrR es modular la expresión del operón *acrAB* para evitar la producción excesiva de la bomba de expulsión, mientras que otros reguladores globales son responsables principalmente de la inducción de la expresión de *acrAB* y *tolC*.

Mutaciones en *acrR* desreprimen la expresión de *acrB* (140), dando lugar a la hiperexpresión de la bomba de expulsión. Se han encontrado estas mutaciones en el gen *acrR* de aislamientos clínicos de *E. coli*, *S. enterica* serovar *typhimurium* y *E. aerogenes* (103, 141, 142). Webber y colaboradores (143) confirmaron que la sustitución de Cys por Arg45 en AcrR de *E. coli* daba lugar a una mayor expresión de AcrB, así como a las

bajas concentraciones acumuladas de ciprofloxacino en seis cepas de *E. coli*. La expresión de *acrB* también se ve afectada por el regulador de *quorum-sensing* SdiA (144).

La comparación de mutaciones en genes que codifican represores locales en diferentes cepas de bacterias Gram-negativas reveló que la mayoría de las sustituciones en la proteína tenían lugar en el motivo HTH implicado en la unión al ADN del gen estructural, como por ejemplo *acrB*. También se han observado deleciones que hacen que el represor sea inactivo.

Aunque AcrR reprime tanto su propia transcripción como la de *acrAB*, no está implicado en la inducción de la expresión de *acrAB* y *acrR* en respuesta a condiciones generales de estrés (53).

En *E. coli*, la transcripción de *acrAB* está controlada en un nivel más global de regulación por las proteínas homólogas MarA, SoxS y Rob, pertenecientes a la familia AraC/XylS de reguladores transcripcionales (145-147). Las proteínas incluidas dentro de esta familia activan muchos genes diferentes, algunos de ellos implicados en resistencia a antimicrobianos y resistencia a estrés oxidativo, control del metabolismo microbiano y patogénesis.

Según estudios hechos en *E. coli*, la expresión de cada uno de estos activadores está regulada de forma diferente.

El gen que codifica el activador transcripcional MarA forma parte del locus regulador *mar* que está formado por el operón *marRAB* y el gen *marC* (Figura 1.10), que se transcriben en dirección opuesta. La transcripción de *marA* está reprimida por la proteína MarR, codificada dentro del mismo operón. Tanto MarA como MarR se unen a *marO* (132), una región de ADN que separa las dos regiones transcripcionales y contiene un gran número de sitios de unión para proteínas reguladoras dentro y alrededor del promotor de *marRAB*.

MarA activa su propia transcripción y la de un conjunto grande de promotores (entre los que se encuentra el promotor de *acrAB*) mediante la unión a una secuencia de ADN de 20 pb conocida como *marbox* que está localizada en la región promotora de los genes objeto de regulación. La secuencia consenso de *marbox* es degenerada y asimétrica (AYnGCACnnWnnRYAAAY) (135, 148). Sin embargo, para permitir su activación, las

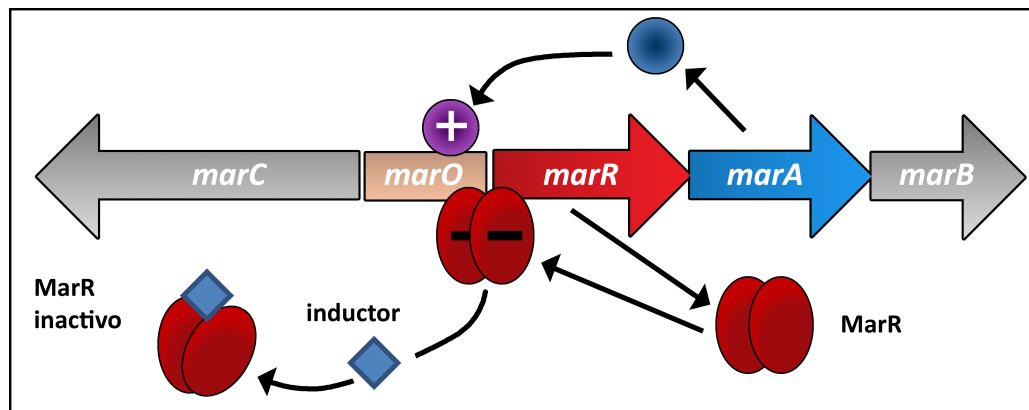


Figura 1.10. Representación esquemática del operón *marRAB*.

cajas *marbox* tienen que estar configuradas en una orientación específica y a una distancia relativa de las cajas promotoras -35 y -10.

MarR juega un papel crucial en el control de la concentración intracelular del activador MarA. Aunque MarR reconoce secuencias distintas a las que se une MarA en la región *marO*, existe un cierto grado de competitividad entre ellas (149).

Se ha visto que la inducción de la expresión del gen *marA* se debe a la desrepresión de éste por parte de MarR. Compuestos como el salicilato se unen al represor MarR interfiriendo en la unión de éste a la región *marO*, lo cual hace que la actividad represora de MarR sea interrumpida (53).

SoxS, efector del regulón global de respuesta a estrés oxidativo *soxRS*, y Rob, son proteínas homólogas a MarA. Estos activadores transcripcionales además de inducir la expresión de *marRAB*, son capaces de activar directamente el mismo conjunto de promotores que MarA. Por eso, no es sorprendente que la mayoría de residuos del dominio de unión a ADN de MarA identificados como importantes para la interacción con el ADN estén muy conservados en las proteínas SoxS y Rob (150).

La expresión de *soxS* es activada por la forma oxidada de SoxR, generada después de la exposición a superóxidos (151). SoxR es un activador transcripcional local que forma parte del operón *soxRS* (Figura 1.11) y se transcribe en dirección opuesta a *soxS*.

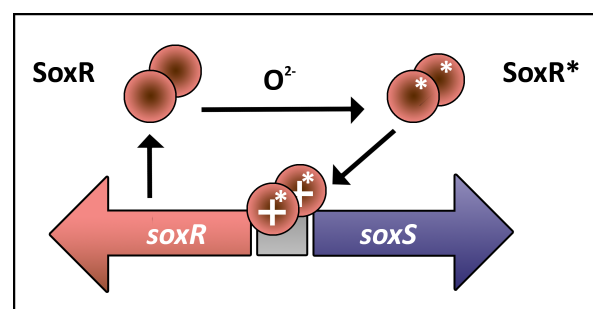


Figura 1.11. Representación esquemática del operón *soxRS*.

Rob, por otra parte, es una proteína que se expresa constitutivamente, que tiene un efecto modesto en el nivel de expresión de *marRAB*, a pesar de ser expresado a un nivel relativamente alto y de ser capaz de inducir la expresión de *acrAB* en cepas defectivas en el regulón *mar* (152, 153). Sin embargo, a diferencia de SoxS y MarA, Rob tiene un dominio C-terminal adicional que está implicado en la unión de moléculas efectoras capaces de alterar la actividad de Rob (154).

En *E. coli* y otras especies de la familia Enterobacteriaceae, ciertas proteínas de membrana externa (porinas) están sujetas a regulación por parte de estos activadores transcripcionales. Cuando cada uno de estos activadores se hiperexpresa, se produce un ARN antisentido, *micF* (155), que reprime la síntesis de la proteína de membrana externa OmpF, evitando la entrada de algunos agentes antimicrobianos (156). Por lo tanto, la hiperexpresión de estos activadores transcripcionales incrementa la expulsión de compuestos tóxicos (incluyendo antibióticos clínicamente relevantes) y reduce la permeabilidad de membrana.

La hiperexpresión de manera constitutiva de *soxRS* en aislamientos clínicos de *S. enterica* (157) incrementa la resistencia a quinolonas debido a mutaciones puntuales en *soxR* que conducen a la generación de manera constitutiva de la forma activa de SoxR, dando lugar a una elevada expresión de los genes reguladores *mar* y *sox*. También se han descrito en *E. coli* mutaciones en genes reguladores, incluyendo *soxR* y *marR* (142, 158-160).

La hiperexpresión de Rob en *E. coli* está implicada tanto en el aumento de la tolerancia de la bacteria a solventes orgánicos como en la resistencia de bajo nivel a diferentes agentes antimicrobianos, debido al incremento de la expresión del sistema AcrAB-TolC (130).

En aislamientos de *Klebsiella*, *Salmonella*, *Enterobacter* y *Citrobacter* se ha identificado un nuevo activador que no actúa en *E. coli* llamado RamA (161).

RamA también pertenece a la familia AraC/XylS y está estrechamente relacionado con las proteínas MarA y SoxS (137). Al igual que MarA, un aumento en la expresión de *ramA*, está ligado a un aumento de la expresión de la bomba de expulsión AcrAB-TolC, lo cual confiere resistencia a diferentes clases de antibióticos (162, 163). Este

fenotipo multirresistente está mediado únicamente a través del operón *acrAB*, pues la hiperexpresión de *ramA* en cepas defectivas en *acrAB* no produce el mismo fenotipo (163).

La expresión de *ramA* está controlada a nivel transcripcional. Estudios realizados en *K. pneumoniae* (164) y *S. enterica* serovar *typhimurium* (165) han identificado un gen regulador tipo tetR llamado *ramR* en la región upstream de *ramA* que actúa como su regulador. Se ha visto que ciertas mutaciones en el gen *ramR* de estas cepas están directamente ligadas a la hiperexpresión de *ramA*. Los análisis bioinformáticos realizados en ambas cepas sugieren que RamR se une a una secuencia palindrómica que está o superpuesta o *downstream* de la secuencia de la caja -10 del gen *ramR* (164, 165). En *K. pneumoniae* y especies de *Enterobacter*, la organización genómica del locus *ramR-ramA* (Figura 1.12) está conservada comparada con *Salmonella*, aunque estas bacterias también llevan el gen *romA* (161).

Ciertas mutaciones en *ramR*, que dan lugar a una proteína no funcional, producen la activación de *ramA*. Sin embargo, todavía no se conoce el efecto que tiene la pérdida de

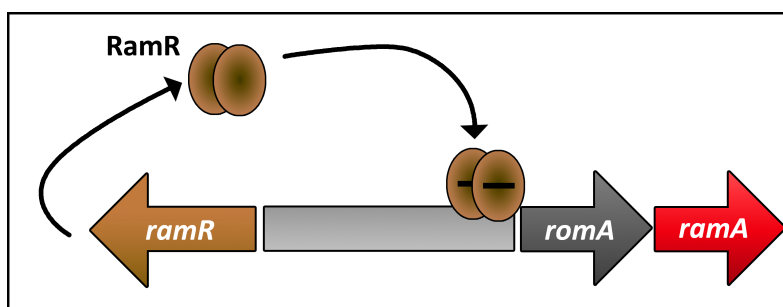


Figura 1.12. Representación esquemática del operón *ramRA*.

función de RamR sobre los genes circundantes dentro del locus, como por ejemplo sobre *romA*. La hiperexpresión de *ramA* se ha asociado a multirresistencia en aislamientos de *S. enterica* serovar *typhimurium*, *E. aerogenes* y *K. pneumoniae* (137, 163, 166, 167).

En conjunto, la activación de la expresión de *acrAB* y *tolC* por varios reguladores globales en respuesta a una amplia gama de condiciones de estrés sugieren que la función fisiológica primaria del complejo AcrAB-TolC es la exportación de una amplia variedad de compuestos tóxicos relacionados con el estrés y la muerte bacteriana, haciendo que la bacteria pueda adaptarse a una gran variedad de condiciones ambientales.

1.2.4. Bombas de expulsión y desarrollo de resistencia a antibióticos.

Casi todos los compuestos antimicrobianos, tanto sintéticos como naturales, que han sido empleados para tratar las infecciones bacterianas son sustratos de una o varias bombas de expulsión. La inmensa mayoría de los genes que codifican bombas de expulsión requieren altos niveles de expresión para que ocurra una expulsión significativa de antimicrobianos clínicamente relevantes.

Para algunos antibióticos usados en clínica, el impacto clínico de la hiperexpresión de bombas de expulsión consiste en que confiere multirresistencia y por ello posibilidades de fracaso clínico. Sin embargo, también hay evidencias que sugieren que el incremento de la expresión de sistemas de expulsión puede ser el primer paso para la emergencia de bacterias resistentes a antimicrobianos clínicamente relevantes. Se ha visto que la reserpina (un inhibidor de bombas de expulsión multidroga) suprime la emergencia *in vitro* de *S. aureus* resistentes a norfloxacin (168) y *S. pneumoniae* resistente a ciprofloxacino (169, 170).

Lomovskaya y colaboradores (171) también observaron que el inhibidor de bombas de expulsión MC-207-110 suprime la emergencia de *P. aeruginosa* resistente a levofloxacino. Se propuso que la inhibición de la expulsión origina altas concentraciones intracelulares teniendo un impacto en la concentración preventiva de mutantes (CPM), de tal manera que para *S. aureus* los valores de CMI proporcionada por mutaciones en el gen que codifica la topoisomerasa (proteína diana del antibiótico) son demasiado bajos para permitir la supervivencia (168).

Desde otro punto de vista, al incrementar la expulsión de antimicrobianos, la concentración intracelular de los mismos se reduce, de tal manera que la bacteria puede sobrevivir más tiempo que el estimado a partir de la CMI de ese organismo. Durante este tiempo y dentro de esta población de bacterias, podrían darse mutaciones espontáneas en genes que codifican proteínas diana, como por ejemplo *gyrA* en *E. coli*. Una prueba que apoya esta hipótesis consiste en que la supresión de *acrAB* en *E. coli* con dos mutaciones en *gyrA* provoca que la bacteria se muestre hipersensible a las fluoroquinolonas, lo que sugiere que la bomba de expulsión AcrAB funcional es esencial para la resistencia. Baucheron y colaboradores (172) inactivaron el gen *acrB* en *S. enterica* serovar *typhimurium* DT204 (que también contiene mutaciones

en los genes que codifican la topoisomerasa), dando lugar a bajas CMIs, algunas de las cuales estaban por debajo del punto de corte recomendado para estos agentes y estas especies. Además, ciertas cepas de *S. enterica* serovar *typhimurium* defectivas en *tolC* no dan lugar a mutantes resistentes a ciprofloxacino *in vitro* (173).

Estos datos indican que el sistema de expulsión AcrAB-TolC de *E. coli* y *S. enterica* serovar *typhimurium* son importantes para el desarrollo de resistencia a fluoroquinolonas y otros agentes.

Por otra parte, la exposición a biocidas (como los desinfectantes, muy usados en el ambiente hospitalario) puede afectar a la población bacteriana, seleccionando cepas hiperproductoras de bombas de expulsión y, por consiguiente, resistentes a varias familias de antibióticos. Además, como ya ha sido mencionado anteriormente, este tipo de compuestos son capaces de inducir la expresión de los sistemas de expulsión por medio de la activación de reguladores globales, por lo que es importante sopesar los riesgos de la selección de bacterias resistentes a antibióticos por el uso de biocidas correctamente.

1.2.5. Bombas de expulsión y virulencia bacteriana.

Además del papel establecido en la resistencia antimicrobiana, se ha visto que las bombas de expulsión están implicadas en la patogenicidad bacteriana, a través de la colonización y supervivencia de la bacteria en el huésped. Algunas bombas de expulsión exportan no sólo antibióticos y otras sustancias como detergentes y colorantes, sino que también son capaces de reconocer y expulsar agentes antimicrobianos derivados del hospedador. Esto sugiere que el papel fisiológico de estos sistemas de expulsión es la evasión de estas moléculas naturales para permitir a la bacteria sobrevivir en su nicho ecológico.

El primer paso de la infección microbiana es la colonización por parte del patógeno de un portal de entrada como puede ser la piel o las superficies mucosas del cuerpo humano. La colonización de superficies mucosas puede ser inhibida por compuestos producidos por el hospedador como son las sales biliares, ácidos grasos de cadena larga y péptidos antimicrobianos (Figura 1.13) (175-177).

Las bacterias necesitan mecanismos para evitar el efecto de estas moléculas con el objetivo de colonizar el tejido y causar infección, y son las bombas de expulsión las encargadas de realizar esta tarea. También es posible que, en algunas especies, las bombas de expulsión exporten determinantes de virulencia como adhesinas, toxinas u otras proteínas que son importantes para la colonización e infección de células animales y humanas. Este papel en patogenicidad ha sido descrito en bombas de expulsión de la familia RND y MATE (78).

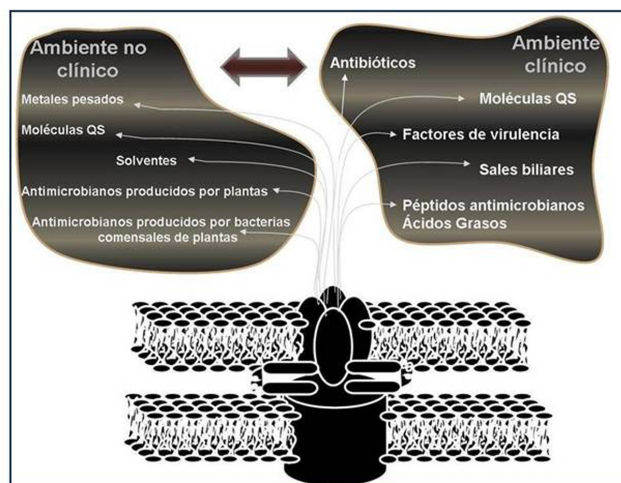


Figura 1.13. Papel que ejercen las bombas de expulsión en ambientes clínicos y no clínicos. Figura modificada a partir de la referencia (174).

Varios estudios han demostrado que la inactivación de esas bombas de expulsión en bacterias Gram-negativas tiene un efecto deletéreo en la capacidad de la bacteria para ser patogénica en modelos animales.

Lacroix y colaboradores (178) han observado que la inactivación de *acrAB* impide la colonización intestinal por parte de *Salmonella typhimurium* en un modelo murino. Se observaron los mismos resultados en *Francisella tularensis* (179).

La bomba de expulsión CmeABC de *Campylobacter jejuni* confiere resistencia a sales biliares, ácidos grasos y detergentes, entre otros compuestos, y su actividad es necesaria para colonizar con éxito el tracto intestinal de pollo (180). La inhibición de la función de esta bomba podría controlar la resistencia a antibióticos así como prevenir la colonización del hospedador por parte de *C. jejuni*.

Como se menciona anteriormente, los ácidos grasos de cadena larga también pueden prevenir la colonización del hospedador por parte de la bacteria. En algunos casos la misma bomba de expulsión está implicada en resistencia a sales biliares y ácidos grasos. Por ejemplo AcrAB de *E. coli* protege a la bacteria del efecto del decanoato que se encuentra en las superficies mucosas (128).

Muchas cepas de *N. gonorrhoeae* aisladas de hombres con infecciones rectales son

resistentes a ácidos grasos, siendo esta resistencia mediada por bombas de expulsión (181). En el mismo sentido, Jerse y colaboradores (182) mostraron que la bomba de expulsión MtrCDE de *N. gonorrhoeae* es importante para la infección del tracto genito-urinario en ratones hembra.

En *Yersinia enterocolitica*, el sistema de expulsión RosAB interviene en la resistencia frente a péptidos antimicrobianos (183). La inducción de la expresión de *rosAB* en presencia de péptidos antimicrobianos a 37°C permite a *Y. enterocolitica*, un patógeno importante con un hábitat ambiental, tolerar esos compuestos durante la colonización del hospedador.

A parte de su papel en la resistencia a compuestos antimicrobianos presentes en las superficies mucosas, las bombas de expulsión pueden tener también una implicación directa en la virulencia bacteriana. Las bacterias usan muchos mecanismos para establecer una infección en el hospedador y evitar sus defensas, incluyendo la producción de toxinas formadoras de poro y enzimas de degradación. Por ejemplo, la proteína de membrana externa TolC es esencial para la secreción de hemolisina (184), y colicina V (185), de la misma manera la secreción de la toxina RTX requiere la función de TolC en *Vibrio cholerae* (186, 187).

Hirakata y colaboradores (188) examinaron la capacidad de *P. aeruginosa* para invadir células epiteliales MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*). Observaron que las cepas defectivas en MexAB-OprM mostraban una reducción en la capacidad de invadir esas células. Asimismo, vieron que los niveles de invasión eran restaurados cuando los cultivos celulares infectados con las cepas defectivas en la bomba de expulsión eran complementados con el sobrenadante de cultivos celulares infectados con cepas salvajes (portadoras de la bomba de expulsión MexAB-OprM). Este hecho llevó a los autores a concluir que este sistema de expulsión media la liberación de factores de virulencia esenciales para la patogénesis. Esta hipótesis también fue apoyada por los resultados obtenidos en un modelo experimental de neumonía en rata, donde incluso en ausencia de tratamiento antibiótico, se identificaron aislamientos de *P. aeruginosa* que hiperexpresaban la bomba de expulsión Mex (189).

La virulencia es un fenómeno complejo que requiere la expresión coordinada de diferentes genes (190), por lo que el proceso de colonización y/o infección de un

microorganismo hacia un huésped va a requerir posiblemente y en muchos casos, una respuesta compleja y una expresión coordinada con sistemas de transporte concomitante a factores de patogenicidad y/o virulencia. Si las bombas de expulsión multidroga están implicadas en este fenómeno, cabría esperar, al menos en algunos casos, la existencia de una regulación cruzada con factores de virulencia establecidos. De hecho, esto se ha demostrado para algunos sistemas. El activador transcripcional de *E. coli* MarA regula la expresión de un conjunto de genes (aproximadamente 60) (191). Entre esos genes se encuentra *acrAB* así como genes implicados en estrés oxidativo (por ejemplo, *zwf*, *frp* y *sodA*) y en el metabolismo del hierro (por ejemplo, *hemB*, *fumC*, *fecA* y *acnA*), los cuales tienen un posible papel en la supervivencia en el hospedador.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El presente estudio tiene un enorme potencial desde el punto de vista clínico y traslacional ya que pretende aplicar el conocimiento básico acerca del funcionamiento de las bombas de expulsión como mecanismo de resistencia a los antimicrobianos y a la mejora de la práctica clínica diaria.

La mayoría de los antibióticos comercializados en los últimos años son inefectivos contra bacterias Gram-negativas a causa de la acción de este tipo de transportadores, favoreciendo la emergencia de cepas multirresistentes causantes de infecciones nosocomiales, lo que supone actualmente un serio problema en medicina al estar limitadas las opciones terapéuticas.

Los sistemas de expulsión como AcrAB-TolC confieren resistencia natural a sustancias producidas por el hospedador y se ha demostrado que juegan un papel importante en la colonización y persistencia de la bacteria en el huésped.

Así, en el presente trabajo se planteó el desarrollo de los siguientes objetivos:

1. Identificar y caracterizar desde un punto de vista genético y microbiológico la bomba de expulsión AcrAB-TolC de *Enterobacter cloacae*. Así como determinar la implicación de este tipo de sistema de expulsión en la resistencia a antimicrobianos en esta especie.
2. Evaluar la implicación de AcrAB-TolC en la *fitness*, tanto *in vitro* como *in vivo*, y en la virulencia de *E. cloacae* en un modelo de infección experimental de ratón.
3. Abordar, mediante análisis genético, la búsqueda de posibles reguladores de AcrAB-TolC de *E. cloacae*, lo que nos permitirá ahondar en el conocimiento de las bases moleculares de la resistencia antibiótica.
4. Entender el papel que los sistemas de expulsión antibiótica tienen en la adaptación bacteriana a un medio hospitalario y como esto puede contribuir al desarrollo de un fenotipo multirresistente.

3. CAPÍTULOS

3.1. Capítulo I: Caracterización de la bomba de expulsión AcrAB-TolC de *Enterobacter cloacae* y análisis de su implicación en la resistencia a antibióticos en un aislamiento clínico.

Enterobacter cloacae es un patógeno clínico emergente responsable de diferentes infecciones nosocomiales. A menudo, el tratamiento de estas infecciones es complicado debido al alto porcentaje de cepas resistentes a desinfectantes y otros agentes antimicrobianos presentes en el ambiente hospitalario. El fenómeno de multirresistencia está frecuentemente asociado con la hiperexpresión de transportadores que reconocen y expulsan eficazmente al exterior de la célula un amplio rango de compuestos estructuralmente no relacionados. De entre todos los transportadores descritos, las bombas de expulsión pertenecientes a la familia RND (*resistance-nodulation-division*) son las más relevantes desde el punto de vista clínico. Estos sistemas son capaces de reconocer un amplio rango de compuestos tóxicos, incluyendo los antibióticos (192).

Un ejemplo bien estudiado es el sistema de expulsión multidroga AcrAB-TolC de *Escherichia coli*, el cuál confiere resistencia a una amplia variedad de compuestos, incluyendo detergentes, colorantes y agentes antimicrobianos como bromuro de etidio, cristal violeta, ácidos biliares, tetraciclina, cloranfenicol, fluoroquinolonas, β -lactámicos, eritromicina y ácido fusídico (193, 194).

El objetivo del presente estudio fue caracterizar los genes que codifican la bomba de expulsión AcrAB-TolC de *E. cloacae*, y determinar la implicación de este sistema de expulsión en el fenotipo multirresistente de una cepa clínica, EcDC64, aislada de un exudado de herida de un paciente ingresado en la unidad de cuidados intensivos del C.H.U. A Coruña. El aislamiento bacteriano se identificó mediante MicroScan (Dade Behring, Barcelona) y se confirmó por API 20E (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Al realizar el análisis de sensibilidad a diferentes agentes antimicrobianos se observó que la cepa clínica EcDC64 presentaba un amplio perfil de resistencia a varios compuestos tóxicos incluyendo detergentes, colorantes y antibióticos. Mostró un alto grado de resistencia a varias familias de antibióticos como son los β -lactámicos (incluidos imipenem y meropenem), macrólidos, clindamicina, tetraciclina, rifampicina, ácido

fusídico o linezolid, además de una sensibilidad reducida a otras familias de antibióticos como las fluoroquinolonas y aminoglucósidos.

Para analizar la contribución de la bomba de expulsión AcrAB-TolC a este fenotipo multirresistente se clonaron y secuenciaron los genes que codifican este sistema. El análisis de la secuencia de *acrR*, *acrA*, *acrB* y *tolC* mostró que estos genes codificaban proteínas que presentaban un alto grado de identidad (79,8 %, 84 %, 88 % y 82 %, respectivamente) con sus homólogas de *E. aerogenes*. Se analizó además, mediante RT-PCR a tiempo real, el nivel de expresión del gen *acrA*, componente de la bomba de expulsión, así como de los genes que codifican las porinas OmpC y OmpF. El resultado de este análisis determinó que la cepa clínica objeto de estudio presentaba una hiperexpresión de la bomba de expulsión AcrAB-TolC, así como una permeabilidad reducida.

Finalmente, el papel de AcrAB-TolC en el incremento de resistencia de *E. cloacae* EcDC64 a varias familias de antibióticos se demostró mediante diferentes aproximaciones. Se determinó la CMI a los diferentes agentes antimicrobianos en presencia del inhibidor PA β N (20 μ g/mL), revelando un incremento de sensibilidad a la mayoría de compuestos analizados, lo cual muestra la existencia de una expulsión activa en EcDC64. Por otra parte, se inactivó el sistema de expulsión al interrumpir el gen *acrA* con un gen de resistencia a kanamicina. El análisis de esta cepa mutante mostró un perfil de sensibilidad similar al de la cepa salvaje en presencia de PA β N, aunque se observaron algunas excepciones que ponen de manifiesto la actividad de sistemas de expulsión adicionales en *E. cloacae* EcDC64. Y, por último, AcrAB-TolC fue reprimida mediante la hiperexpresión del gen *acrR* en la cepa salvaje EcDC64, obteniendo como resultado un patrón de resistencia similar al resultante de la inhibición de la bomba de expulsión mediante las aproximaciones anteriormente mencionadas. Sin embargo, el efecto fue menor que en los casos anteriores, lo que sugiere que el represor AcrR es un modulador secundario de la transcripción de *acrAB* (131).

Ver anexo 7.1.

3.2. Capítulo II: Implicación de la bomba de expulsión AcrAB-TolC en la resistencia, en la *fitness* y la virulencia de *Enterobacter cloacae*.

Las bombas de expulsión multidroga, como AcrAB-TolC, han emergido como mecanismos de resistencia clínicamente relevantes en bacterias patógenas. Estos sistemas confieren resistencia innata a un amplio rango de compuestos tóxicos, como antibióticos, colorantes, detergentes y desinfectantes, en miembros de la familia Enterobacteriaceae (78, 192) y pueden estar asociados con multirresistencia.

Para causar infección, las bacterias patógenas necesitan mecanismos para evitar el efecto de compuestos producidos por el huésped, tales como sales biliares, ácidos grasos de cadena larga y péptidos antimicrobianos (78, 174). Las bombas de expulsión son las responsables de expulsar estos compuestos por lo que están implicadas en la patogénesis bacteriana. Aunque *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes* son las especies de *Enterobacter* que causan infecciones nosocomiales con mayor frecuencia, poco se conoce acerca de su potencial patogénico. En el presente capítulo se ha evaluado el efecto de la inactivación de AcrAB-TolC sobre la resistencia a antibióticos, la *fitness*, tanto *in vitro* como *in vivo*, y la virulencia de *E. cloacae* empleando un modelo de infección experimental. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron dos cepas clínicas de *E. cloacae*, EcDC64, que mostró un fenotipo multirresistente y la hiperexpresión de la bomba de expulsión AcrAB-TolC, y Jc194, que mostró una mayor sensibilidad a los antimicrobianos respecto a EcDC64 y un nivel basal de expresión de AcrAB-TolC.

Se inactivaron los genes *acrA* y *tolC* de ambos aislamientos clínicos para obtener los mutantes Ec Δ *acrA* y Ec Δ *tolC*, y Jc Δ *acrA* y Jc Δ *tolC*, respectivamente. El análisis de la sensibilidad a antibióticos de estos derivados isogénicos en comparación con las correspondientes estirpes salvajes reveló que la pérdida de cada uno de los componentes estructurales de la bomba de expulsión AcrAB-TolC modificaba el perfil de resistencia. Tal como se ha descrito previamente, la inactivación del gen *acrA* en la cepa multirresistente EcDC64 produjo un incremento en la sensibilidad a los antibióticos respecto a la cepa salvaje. Además se ha analizado el papel de AcrA en la cepa Jc194, siendo las CMI's de ambas cepas defectivas en el gen *acrA* similares. Por otro lado, tal como ocurre con *acrA*, la interrupción del gen *tolC* incrementó la sensibilidad de ambas cepas clínicas a

diferentes familias de antibióticos, aunque en este caso el aumento de sensibilidad fue más moderado, lo cual puso de manifiesto la diferente función de AcrA y TolC como partes integrantes del mismo sistema de expulsión.

Para evaluar la implicación de AcrAB-TolC en la *fitness* de *E. cloacae* se realizaron experimentos de competición, tanto *in vitro* como *in vivo*, así como curvas de crecimiento con las dos cepas clínicas y sus derivados *knock-out*. Al analizar las curvas de crecimiento se observó que ninguna de las cepas *knock-out* de EcDC64 mostró diferencias significativas en cuanto a la tasa de crecimiento, en comparación con la cepa salvaje. Sin embargo, la cepa mutante Jc194 defectiva en *acrA* mostró una tasa de crecimiento menor durante las dos primeras horas de cultivo en comparación con la cepa salvaje y la cepa mutante defectiva en *tolC*. Después de las 12 horas de cultivo, la densidad óptica de la cepa Jc194 y la de sus derivados mutantes fue prácticamente la misma. El índice de competición (IC) definido como el ratio cepa mutante/cepa salvaje, reveló que ambos genes *acrA* y *tolC* juegan un papel importante en la *fitness* de *E. cloacae*, ya que ésta se redujo claramente en las cepas mutantes. El valor medio de los IC obtenidos *in vitro* e *in vivo* fueron respectivamente, 0,42 y 0,3 para Ec Δ *acrA*/EcDC64, 0,24 y 0,38 para Ec Δ *tolC*/EcDC64, 0,15 y 0,11 para Jc Δ *acrA*/Jc194 y 0,38 y 0,39 para Jc Δ *tolC*/Jc194. De acuerdo con estos datos se realizaron ensayos de virulencia para evaluar la capacidad de las cepas mutantes de causar una infección sistémica en un modelo murino experimental. Los resultados obtenidos mostraron las diferencias existentes entre las cepas mutantes y salvajes, ya que la carga bacteriana presente en los ratones infectados con las cepas mutantes resultó ser menor que en aquellos infectados con las cepas salvajes, siendo la atenuación *in vivo* observada en las cepas defectivas en *acrA* más dramática que aquella observada en las cepas defectivas en *tolC*.

Ver anexo 7.2.

3.3. Capítulo III: Efecto de los activadores transcripcionales SoxS, RobA y RamA en la expresión de la bomba de expulsión multidroga AcrAB-TolC en *Enterobacter cloacae*.

Enterobacter cloacae es un importante patógeno nosocomial responsable de varias infecciones, incluyendo sepsis, infecciones del tracto respiratorio, del tracto urinario, de heridas y meningitis entre otras. Ciertas cepas multirresistentes han causado brotes hospitalarios en unidades de cuidados intensivos causando un grado de mortalidad y morbilidad importante. Además, en numerosas ocasiones el tratamiento de la infección resulta extremadamente complicado a causa de la resistencia de estas bacterias a múltiples antibióticos (3).

El control de la permeabilidad de membrana es un paso clave para regular la concentración intracelular de antibióticos. Son las bombas de expulsión junto con las porinas los componentes de membrana que realizan principalmente esta función. Los sistemas de expulsión confieren una resistencia innata a un amplio rango de compuestos en miembros de la familia Enterobacteriaceae, y en concreto, AcrAB-TolC está implicada en la resistencia de *E. cloacae* a diferentes agentes antimicrobianos, tal y como se ha descrito en el capítulo I de este trabajo. Sin embargo, hasta la fecha se desconocía el mecanismo de regulación de este sistema en *E. cloacae*. En *Escherichia coli*, la expresión de porinas y bombas de expulsión está controlada por varios reguladores globales, los cuales respectivamente, reducen o incrementan la transcripción de genes específicos tales como *acrAB* y *tolC*. La transcripción de *acrAB* se activa por la acción de proteínas reguladoras como MarA, SoxS y Rob en respuesta a diferentes condiciones de estrés. El objetivo de este capítulo consistió en determinar si estos reguladores globales también controlan la expresión de *acrAB* en *E. cloacae*. Para ello, se utilizaron dos aislamientos de *E. cloacae*, EcDC64, que hiperexpresa la bomba de expulsión AcrAB-TolC, y Jc194, que muestra un nivel de expresión basal de esta bomba de expulsión.

Se determinó el perfil de resistencia de ambas cepas a varias familias de antibióticos tales como macrólidos, tetraciclinas o quinolonas, en presencia y ausencia de diferentes compuestos tóxicos incluyendo salicilato, decanoato, paraquat y tetraciclina. Se evaluó por lo tanto el efecto de estas condiciones de estrés en el perfil de resistencia de *E. cloacae*. Los resultados obtenidos revelaron un incremento significativo en la resistencia

de estas cepas a los antibióticos en respuesta a los diferentes compuestos tóxicos.

A la vista de los resultados obtenidos se analizó el nivel de expresión de *acrAB* bajo las diferentes condiciones de estrés con el objetivo de investigar el papel de la bomba de expulsión AcrAB-TolC en el incremento en la resistencia observado en *E. cloacae*. Los resultados obtenidos revelaron que todos los estímulos analizados inducen la expresión de *acrAB*, indicando que la bomba de expulsión se activa en presencia de salicilato, decanoato, paraquat y tetraciclina.

Posteriormente se evaluó el papel de los reguladores SoxS, RobA y RamA en la regulación de AcrAB-TolC en respuesta a los diferentes estímulos. Para ello, se aislaron los genes *soxS*, *robA* y *ramA* de EcDC64 los cuales mostraron un alto grado de identidad con sus homólogos de otros miembros de la familia Enterobacteriaceae. El análisis de la expresión de estos genes en la cepa clínica Jc194 sujeta a las condiciones de estrés descritas anteriormente determinó las diferentes vías de activación de *acrAB*. Los resultados confirmaron un alto nivel de expresión del gen *soxS* bajo condiciones de estrés oxidativo provocado por paraquat, así como la activación de *robA* por efecto del decanoato. Además, la expresión del gen *ramA* se incrementó cuando la cepa Jc194 fue cultivada en presencia de tetraciclina y salicilato.

Para confirmar el efecto de estos reguladores en la expresión de *acrAB* se llevó a cabo, por una parte, la inactivación de cada uno de los reguladores en la cepa multirresistente EcDC64 y, por otro lado, la hiperexpresión de estos mismos reguladores en la cepa Jc194 bajo el control de sus propias regiones promotoras. El efecto que produjo la pérdida y la hiperexpresión de estas proteínas sobre el nivel de expresión de *acrAB* se midió mediante citometría de flujo usando una fusión transcripcional del promotor de *acrAB* a un gen indicador, el gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP). Los resultados obtenidos se confirmaron mediante RT-PCR a tiempo real. Se observó que la expresión de *acrAB* disminuía en los derivados de *E. cloacae* EcDC64 deficientes en SoxS, RobA y RamA, y que aumentaba en la cepa Jc194 al hiperexpresar estos mismos reguladores. Se demostró, por lo tanto, que un incremento en el nivel de expresión de *soxS*, *robA* y *ramA* activa la transcripción de *acrAB*, lo cual desencadena un incremento en la resistencia a antibióticos en *E. cloacae* Jc194. Los datos indican la existencia de una correlación entre el incremento de resistencia a macrólidos, tetraciclina, ketólidos, fluoroquinolonas y

cloranfenicol y los niveles de expresión de *soxS*, *robA*, *ramA* y *acrAB*. Finalmente, los experimentos de unión y migración electroforética confirmaron que cada una de estas proteínas controla directamente la expresión de *acrAB* a través de la unión a su región promotora.

En resumen, los resultados del presente estudio mostraron que los reguladores SoxS, RobA y RamA, pertenecientes a la familia AraC/XylS, juegan un papel importante en el desarrollo de multirresistencia mediada por la bomba de expulsión AcrAB-TolC en *E. cloacae*.

Ver anexo 7.3.

4. DISCUSIÓN

4.1. Discusión capítulo I.

Los sistemas de expulsión multidroga se han convertido en mecanismos de resistencia relevantes en bacterias patógenas. A diferencia de otros mecanismos de resistencia adquiridos por bacterias virulentas a través de transferencia genética horizontal, los genes que codifican bombas de expulsión están presentes en el cromosoma de todos los organismos vivos. La mayoría de estos genes se encuentran en el cromosoma bacteriano y tienen una disposición y estructura conservada, así como unos niveles de expresión regulados de forma estricta (53).

Se han identificado varias clases de bombas de expulsión, entre las cuales, las más relevantes desde el punto de vista clínico son las pertenecientes a la familia RND, responsables de la resistencia innata en bacterias Gram-negativas a múltiples familias de antimicrobianos, muchos de ellos con gran relevancia clínica (53).

En este trabajo se determinó el papel de la bomba de expulsión AcrAB-TolC, perteneciente a la familia RND, como mecanismo de resistencia en una cepa de *Enterobacter cloacae* que presentaba un fenotipo MDR, EcDC64, aislada a partir de un exudado de herida de un paciente ingresado en el Hospital Universitario de A Coruña.

La implicación de AcrAB-TolC en el incremento de resistencia a varios antibióticos en *E. cloacae* EcDC64 se demuestra en el capítulo I a través de diferentes aproximaciones. En primer lugar, las CMI's obtenidas en presencia del inhibidor PA β N, que inhibe de forma inespecífica la función de los sistemas de expulsión, mostraron un incremento en la sensibilidad a diferentes antibióticos respecto a la cepa salvaje. En segundo lugar, se ha observado un incremento en la sensibilidad a muchos antibióticos al inactivar de forma específica la bomba de expulsión AcrAB-TolC a través de la construcción de una cepa defectiva en el gen *acrA* (*EcΔacrA*). Sin embargo, se observaron algunas diferencias en el perfil de resistencia, en función de si la bomba de expulsión era inactivada de forma específica, mediante la construcción de una cepa *knock-out* defectiva en *acrA*, o bioquímicamente de manera inespecífica, lo que sugiere la actuación de sistemas de expulsión adicionales en la cepa EcDC64. Finalmente, la hiperexpresión del gen *acrR* de *Enterobacter aerogenes* en la cepa salvaje EcDC64 resultó en una reducción de las CMI's

a la mayoría de los antibióticos analizados.

El papel que juega la bomba de expulsión en la resistencia a los antibióticos β -lactámicos no ha sido elucidado claramente debido a que el aislamiento clínico EcDC64 usado en el presente estudio es portador de una *ampC* cromosómica cuya hiperexpresión afecta a la mayoría de los antibióticos β -lactámicos. Sin embargo, la CMI a piperacilina, aztreonam, oxacilina y carbapenemas disminuyó cuando la bomba de expulsión AcrAB-TolC fue inactivada tanto de manera inespecífica por el efecto del inhibidor PA β N como específicamente mediante la inactivación de *acrA*. La implicación de este sistema de expulsión en la resistencia a macrólidos y quinolonas se ha descrito previamente como el principal mecanismo de resistencia en algunas especies de Enterobacteriaceae (95, 97, 98, 101-103, 195). Se ha descrito recientemente en *Escherichia coli* una bomba de expulsión perteneciente a la familia ABC que expulsa específicamente macrólidos (196). Este sistema de expulsión podría también estar operando en el aislamiento clínico objeto de estudio, lo cual podría explicar la diferencias encontradas en cuanto a la resistencia a eritromicina entre la cepa salvaje bajo el efecto del inhibidor inespecífico de bombas de expulsión PA β N y la cepa mutante defectiva en *acrA* (baja de >256 a 1 y de >256 a 12 μ g/mL, respectivamente).

Es interesante destacar que este mecanismo puede ser, al menos en parte, el responsable de la resistencia intrínseca de *Enterobacter* a algunos antibióticos usados para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos Gram-positivos, tales como la oxacilina, linezolid, clindamicina, ácido fusídico, novobiocina y rifampicina, aunque probablemente otras bombas de expulsión estén implicadas en la resistencia a ácido fusídico.

En este sentido, se ha demostrado que la concentración intracelular de linezolid en cepas de *E. coli*, *E. aerogenes* y *Citrobacter freundii* es comparativamente baja debido a la expulsión eficiente de la droga por bombas de expulsión pertenecientes a la familia RND (197). Estas observaciones apoyan los datos que presentamos en este trabajo, sin embargo, a diferencia del sistema de expulsión AcrAB-TolC de *E. aerogenes*, que parece no bombear telitromicina, se ha observado que el aislamiento clínico EcDC64 sí lo hace ya que, al analizar la sensibilidad a telitromicina de la cepa defectiva en el gen *acrA* (Ec Δ *acrA*), el halo de inhibición de este antibiótico se incrementó de 9 a 19 mm.

Por otra parte, al igual que sucede en el aislamiento objeto de estudio, la bomba de expulsión AcrAB-TolC de *Proteus mirabilis* y *Klebsiella pneumoniae* se ha asociado con la reducción de sensibilidad a tigeciclina (104, 162), aunque en el presente estudio el incremento de sensibilidad a tigeciclina de la cepa defectiva en el gen *acrA* fue más bajo (la CMI de la cepa *knock-out* fue seis veces menor respecto a la cepa salvaje), lo que pone de manifiesto la importancia de las bombas de expulsión RND en la resistencia a tigeciclina, un antibiótico de alta importancia clínica para tratar las infecciones por bacterias Gram-negativas. En este sentido es interesante destacar que Keeney y colaboradores (198) han descrito recientemente la implicación de AcrAB-TolC en el incremento de resistencia a tigeciclina en *E. cloacae*, aunque los valores que obtuvieron fueron más altos que los que se describen en el presente trabajo. Estas diferencias pueden estar relacionadas con el nivel de expresión de *acrAB* en la cepa clínica EcDC64.

En resumen, en el capítulo I del presente estudio se ha caracterizado la bomba de expulsión AcrAB-TolC en *E. cloacae*. Ésta presenta la misma organización y un alto grado de identidad con su homólogo de *E. aerogenes* y está implicada en la resistencia a la mayoría de antibióticos frecuentemente empleados en clínica.

4.2. Discusión capítulo II.

El papel de la bomba de expulsión AcrAB-TolC en la resistencia antimicrobiana se ha descrito previamente en algunas cepas de la familia Enterobacteriaceae (78, 192). Como se ha demostrado a lo largo del presente trabajo, *E. cloacae* contiene un sistema AcrAB-TolC homólogo al descrito en *E. coli* (199). Hasta ahora, la mayoría de los estudios clínicos sobre este tipo de sistemas se han centrado en la participación de éstos en la resistencia a los antibióticos. Sin embargo, pocos trabajos han examinado el papel que ejercen las bombas de expulsión en la *fitness* y en la virulencia bacteriana. Por lo que en este trabajo se planteó como objetivo determinar cómo la pérdida de la bomba de expulsión AcrAB-TolC afecta a la *fitness* y a la virulencia de *E. cloacae*, un microorganismo cuya relevancia clínica se hace más patente dado el alto nivel de resistencia a antibióticos que desarrolla (41).

En el capítulo II del presente trabajo, se ha analizado la implicación de la bomba de expulsión AcrAB-TolC en la resistencia a antibióticos mediante la inactivación de los genes *acrA* y *tolC* en los aislamientos clínicos EcDC64 y Jc194, que muestran diferencias significativas en la expresión de AcrAB-TolC. Tal como se ha descrito previamente, la inactivación del gen *acrA* en la cepa multirresistente EcDC64 produjo un incremento en la sensibilidad a diferentes antibióticos en comparación con la cepa salvaje (199). Además, se ha analizado el papel del gen *acrA* en la cepa clínica Jc194 que presenta un perfil de mayor sensibilidad a los antibióticos respecto a la cepa EcDC64. En general, las CMI de ambas cepas mutantes defectivas en el gen *acrA* fueron similares, aunque en el caso de la oxacilina, eritromicina y linezolid el incremento de sensibilidad fue mayor en la cepa Jc194. Sin embargo, al analizar las CMI a ciprofloxacino, cloranfenicol y tigeciclina la reducción fue más brusca cuando se inactivó el gen *acrA* en EcDC64, lo cual puede estar relacionado con el mayor nivel de expresión de *acrAB* que muestra la cepa multirresistente EcDC64. Por otro lado, tal como ocurre con el gen *acrA*, la interrupción de *tolC* dio lugar a un aumento moderado de la sensibilidad a antimicrobianos, aunque no afectó a la CMI de algunos antibióticos como la oxacilina y la tetraciclina, lo cual puso de manifiesto la diferente función de AcrA y TolC como partes integrantes de la misma bomba de expulsión.

En cuanto a la resistencia a antibióticos, la supresión del gen *acrA* provocó una mayor reducción en las CMI a los diferentes antibióticos que la inactivación de *tolC*, lo que sugiere que la proteína adaptadora AcrA juega un papel clave en el funcionamiento de la bomba de expulsión de una manera eficiente.

Los estudios realizados en *Salmonella* spp. (200) han demostrado que hay diferencias en los patrones de sensibilidad, dependiendo de qué gen (*acrA*, *acrB* o *tolC*) se inactive, y que el efecto es específico de sustrato. En el presente trabajo, los mutantes más sensibles a los antibióticos utilizados fueron los defectivos en el gen *acrA*. Las diferencias observadas en el patrón de resistencia al inactivar *acrA* o *tolC* pueden ser debidas en parte al carácter promiscuo de ambas proteínas, ya que pueden interaccionar con otros transportadores (78). En efecto, y de acuerdo con los datos obtenidos, la función de AcrA es más restrictiva y menos redundante que la de la proteína de membrana externa TolC. De acuerdo con los datos obtenidos en el presente estudio no se puede descartar la posibilidad de que otra porina pueda asumir el papel de TolC en un momento determinado.

La implicación de las bombas de expulsión pertenecientes a la familia RND en la patogénesis se ha estudiado en diferentes especies como *Salmonella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Neisseria*, entre otros, donde se ha demostrado que la pérdida de funcionalidad de la bomba de expulsión AcrAB-TolC tiene un efecto significativo en el mantenimiento de la competitividad biológica y la capacidad de la bacteria para causar infección (179, 180, 182, 188, 200-208).

Se asume que la resistencia *in vitro* a antibióticos que son sustratos de bombas de expulsión confiere ventajas adaptativas a la bacteria que habita en presencia de esas moléculas. Sin embargo, en un proceso de infección o colonización, las bacterias no siempre se encuentran sometidas a la presión de agentes antimicrobianos, por lo tanto es interesante analizar el coste biológico que tiene la pérdida de un gen específico sin la presencia de estímulos selectivos, como pueden ser moléculas antimicrobianas específicas. Parece que tanto *acrA* como *tolC* son clave en la *fitness* de ambos aislamientos clínicos de *E. cloacae*, pues la inactivación de ambos genes se asoció con una reducción en el índice de competición (IC) tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, la cepa mutante *E. cloacae* Jc194 defectiva en *acrA* mostró un IC mucho

menor que la cepa isogénica salvaje.

En conjunto, los datos sugieren que la inactivación de cada uno de los componentes de forma separada puede tener un impacto diferente en las células bacterianas desde el punto de vista fisiológico y biológico, aunque ambas proteínas, AcrA y TolC, son componentes del mismo mecanismo de expulsión. De acuerdo con estos datos, los ensayos de virulencia en un modelo de infección experimental pusieron de manifiesto las diferencias existentes entre las cepas mutantes y salvajes en cuanto a la capacidad de causar infección, pues la carga bacteriana presente en los ratones infectados con las cepas mutantes era menor que en aquellos infectados con las cepas salvajes. La atenuación *in vivo* observada en las cepas defectivas en *acrA* fue más dramática que aquella observada en las cepas defectivas en *tolC*.

En resumen, en el capítulo II se ha descrito el uso de cepas mutantes específicas para analizar el efecto de la bomba de expulsión AcrAB-TolC en la resistencia a antibióticos, en la *fitness* y la virulencia de *E. cloacae*, demostrándose que los componentes de esta bomba de expulsión no sólo están implicados en la resistencia a diferentes antibióticos, sino que también juegan un papel importante en el mantenimiento de la competitividad biológica, además de ser necesarios para preservar intacta la virulencia de *E. cloacae*.

Finalmente, merece una especial atención la posibilidad de combatir infecciones bacterianas utilizando como estrategia la fabricación de vacunas mediante la atenuación de los aislamientos bacterianos de *E. cloacae* u otros miembros de la familia Enterobacteriaceae, mediante la inactivación de estos genes.

4.3. Discusión capítulo III.

Las bombas de expulsión multidroga son el principal mecanismo de resistencia a diferentes drogas en bacterias Gram-negativas. Diferentes investigadores han estudiado el papel que juega la bomba de expulsión AcrAB-TolC en la resistencia y virulencia en la familia Enterobacteriaceae (78, 174). Los datos de los que disponemos actualmente en *E. coli* y otras Enterobacteriaceae revelan que las bombas de expulsión multidroga se expresan bajo un control transcripcional preciso y elaborado, incluyendo reguladores específicos como AcrR, y reguladores globales como MarA, SoxS y RobA. En *E. coli*, las proteínas activadoras pertenecientes a la familia AraC/XylS interactúan con AcrAB-TolC activando su expresión (209). Dado que AcrAB-TolC tiene un papel predominante en la resistencia intrínseca de *E. cloacae* a un amplio rango de compuestos, tales como antibióticos, colorantes, detergentes y solventes, así como en la *fitness* y virulencia bacteriana (199, 210), el estudio de su regulación es de gran importancia para entender la acción de estas moléculas bactericidas sobre *E. cloacae* y otros organismos relacionados. Así en el capítulo III del presente trabajo se propone caracterizar el mecanismo de regulación de AcrAB-TolC de *E. cloacae* en respuesta a diferentes estímulos extracelulares.

Los genes *mar*, *sox* y *rob* están implicados en un sistema de regulación bien caracterizado en *E. coli* (130, 159, 160, 211) y se podría esperar que el control de la permeabilidad de membrana externa en *E. cloacae* esté regulado de una manera similar. El análisis genómico de *E. cloacae* EcDC64 reveló la presencia de los reguladores globales SoxS y RobA ya detectados en *E. coli*. Por otro lado se identificó la proteína reguladora RamA como parte de un *locus* que muestra la misma organización genética que la encontrada en especies de *Citrobacter* (161) y *Klebsiella* (212), donde el *locus* de *ramA* está compuesto por los genes *romA* y *ramA*, ambos controlados por el represor RamR. El análisis de las secuencias animoacídicas que forman los dominios de unión a ADN de estas proteínas reguladoras mostró un alto grado de identidad, lo que sugiere que ejercen su actividad sobre dianas comunes. Estas proteínas activan un conjunto de promotores mediante su unión a una secuencia específica, degenerada y asimétrica, conocida como *marbox* (135, 148). Esta secuencia *marbox* se encontró en la orientación adecuada cuando se realizó el análisis de la región promotora del operón *acrAB* de ambos aislamientos clínicos de *E. cloacae*.

Se realizaron estudios funcionales desde el punto de vista genómico para determinar el efecto de estos reguladores en la expresión de *acrAB*. Por una parte, se llevó a cabo la inactivación de cada uno de los reguladores en la cepa multirresistente EcDC64 y, por otro lado, la hiperexpresión de estos mismos reguladores en la cepa Jc194 bajo el control de sus propias regiones promotoras. El efecto que produjo la pérdida y la hiperexpresión de estas proteínas en el nivel de expresión de *acrAB* se midió mediante citometría de flujo usando la fusión del promotor de *acrAB* al gen de la proteína verde fluorescente (GFP) como indicador, y se confirmó mediante RT-PCR a tiempo real. Además se analizó el impacto de las proteínas SoxS, RobA y RamA en el perfil de resistencia a antibióticos de *E. cloacae* mediante el análisis de sensibilidad a antibióticos de las diferentes cepas obtenidas.

La activación de *acrAB* es la principal causa de resistencia en cepas que hiperexpresan MarA u otros reguladores globales como SoxS, RobA y RamA (130, 134, 153, 162, 166, 198, 213-218). Chollet y colaboradores (166) han descrito cómo el incremento de la expresión de *acrAB* mediada por la proteína RamA produce un incremento en la resistencia a tetraciclina, cloranfenicol, quinolonas y β -lactámicos en *E. aerogenes*. En el mismo sentido, Hornsey y colaboradores (219) describieron la emergencia de resistencia a tigeciclina en *E. cloacae* a través del regulador RamA. Nuestros hallazgos demostraron que un incremento en la expresión de *soxS*, *robA* y *ramA* desencadenan la aparición de un fenotipo MDR en la cepa sensible *E. cloacae* Jc194. Los datos indican la existencia de una correlación entre el incremento de resistencia a macrólidos, tetraciclina, ketólidos, fluoroquinolonas, y cloranfenicol y los niveles de expresión de *acrAB*, *soxS*, *robA* y *ramA*. Los experimentos de migración en gel demostraron que cada uno de los reguladores controla directamente la expresión de *acrAB* mediante la unión a su región promotora. Por lo tanto, todos estos datos indican que los activadores SoxS, RobA y RamA juegan un papel importante en la regulación de AcrAB-TolC, desatancándose RamA ya que es el responsable del mayor incremento de expresión de *acrAB*.

Estas diferencias en la activación de *acrAB* se reflejaron en el grado de resistencia a quinolonas mostrado por la cepa Jc194. El efecto de RobA fue generalmente más débil tanto a nivel de análisis de la resistencia a antibióticos como de la expresión génica. Esto puede ser debido a que RobA presenta un alto nivel de expresión de manera constitutiva (220) a diferencia de SoxS y RamA, y permanece inactivo hasta ser estimulado por

diferentes señales (134, 221), lo cual podría explicar que un aumento de expresión de *soxS* y *ramA* tenga un mayor efecto en la activación de la bomba de expulsión AcrAB-TolC. Por otra parte, la inactivación de los genes reguladores *soxS*, *robA* y *ramA* en la cepa multirresistente EcDC64 provocó un aumento en la sensibilidad de ésta a diferentes antibióticos (excepto a cloranfenicol) respecto a la cepa salvaje, mostrando las cepas mutantes defectivas en estos genes un perfil de resistencia similar a la cepa Jc194. Sin embargo, sólo la inactivación de *robA* tuvo un efecto significativo en la expresión de *acrAB*, la cual se redujo a la mitad. Estos datos, apoyados por los resultados obtenidos a través del test de sensibilidad a antibióticos, sugieren que RobA juega un papel importante en la resistencia a antibióticos de *E. cloacae* EcDC64. Aunque la inactivación de *soxS* y *ramA* no tuvo un efecto significativo en la expresión de *acrAB*, la pérdida de estas proteínas sí modificó el perfil de resistencia a antibióticos de EcDC64. Esto podría ser debido a que estas proteínas reguladoras controlan otros genes implicados en resistencia a antimicrobianos, lo que explica la modificación en el perfil de resistencia de EcDC64 independiente de AcrAB-TolC (135). Por otra parte, los niveles de expresión de *soxS* y *ramA* son significativamente reducidos en comparación con el nivel de expresión de *robA*. Por lo tanto, el efecto de la inactivación de los genes *soxS* y *ramA* puede pasar desapercibido en presencia de la proteína RobA funcional.

En *E. coli*, la expresión de *acrAB* se activa en respuesta a diferentes señales, como ácidos aromáticos débiles (e.g. salicilato), superóxidos (e.g. generados por paraquat), sales biliares, ácidos grasos como el decanoato, o tetraciclina (222). Estos compuestos tóxicos activan la transcripción de reguladores globales y éstos, a su vez, activan la bomba de expulsión AcrAB-TolC (134, 151, 223, 224). En el presente estudio se ha demostrado que en *E. cloacae* tiene lugar un mecanismo similar. La expresión de AcrAB-TolC se activó en presencia de salicilato, decanoato, paraquat y tetraciclina, lo cual tuvo un efecto en el perfil de resistencia a antibióticos de *E. cloacae*, que mostró una reducción en la sensibilidad a diferentes antibióticos. Por lo tanto, los perfiles de inducción en *E. cloacae* son muy similares a los perfiles de inducción previamente descritos en otras especies pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae (134, 151, 223, 224). El incremento en la expresión de *acrAB* está correlacionado, salvo algunas excepciones, con el grado de resistencia mostrado por *E. cloacae* Jc194 a diferentes antibióticos. La inducción con tetraciclina desencadenó el mayor incremento de resistencia a todos los antibióticos

estudiados. El efecto más débil se observó cuando la cepa Jc194 fue estimulada con decanoato. Además, la resistencia a cloranfenicol no se vio modificada por ninguno de los compuestos analizados. El incremento de resistencia a eritromicina, telitromicina y ciprofloxacino por parte de Jc194 en respuesta a salicilato, paraquat y tetraciclina fue similar. Sin embargo, el salicilato y el paraquat como inductores tuvieron un menor efecto en la resistencia a tetraciclina y cloranfenicol en comparación con la tetraciclina.

Las bacterias deben distinguir entre las diferentes condiciones de estrés y desencadenar una respuesta apropiada. Cada activador se regula en respuesta a diferentes señales provocando finalmente la inducción de *acrAB*. Tal como se ha descrito anteriormente, la bomba de expulsión AcrAB-TolC de *E. cloacae* está regulada por los activadores SoxS, RobA y RamA, dando lugar su hiperexpresión a la aparición de un fenotipo MDR mediado por bombas de expulsión. Los datos presentados en este estudio revelan que *acrAB* de *E. cloacae* es activado a través de diferentes vías dependiendo del estímulo aplicado. Se demostró que el salicilato induce la expresión de *ramA* en *E. cloacae*, además de activar la transcripción de *marA* tal como se había descrito previamente en *E. coli* (223). También se observó un incremento moderado en los niveles de expresión de *soxS* y *robA* por acción del salicilato, a diferencia de lo que ocurre en *Salmonella* donde la expresión de *robA* está reprimida (225). De este modo, los datos de expresión obtenidos, apoyados por el análisis de sensibilidad a antibióticos, sugieren que el salicilato induce la expresión de la bomba de expulsión AcrAB-TolC principalmente a través del regulador MarA. En *E. coli*, la tetraciclina induce la expresión de *marA*, *soxS* y *robA*, aunque la intensidad del efecto es diferente (224). En el presente trabajo se observó que la tetraciclina desencadena una respuesta adaptativa, mediada por bombas de expulsión, similar a la observada en *E. coli*. Sin embargo, en *E. cloacae* la tetraciclina activó RamA en lugar de MarA. El efecto de este antibiótico sobre la expresión de *ramA* fue mayor que el efecto sobre *soxS* y *robA*, lo que sugiere que el activador RamA juega un papel clave en la regulación de AcrAB-TolC en respuesta al estrés ocasionado por tetraciclina. Por otra parte el perfil de resistencia a antibióticos mostrado por *E. cloacae* EcDC64 defectivo en *ramA* apoya esta hipótesis, pues la resistencia a antibióticos no fue inducida por tetraciclina en ausencia del activador RamA. Además, *E. cloacae* mostró una respuesta frente a estrés oxidativo muy similar a la descrita en *E. coli* (226), donde *soxS* está altamente hiperexpresado y la expresión de *robA* se reduce en respuesta a paraquat. En concordancia con estos datos, se observó un

incremento de resistencia mediado por AcrAB-TolC en la cepa salvaje *E. cloacae* EcDC64 sometida a estrés oxidativo. Sin embargo, cuando la proteína reguladora SoxS no era funcional, la inducción con paraquat no desencadenó un incremento de resistencia en *E. cloacae* sino que incrementó la sensibilidad a antibióticos, lo cual confirma la implicación de SoxS en la regulación del sistema de expulsión AcrAB-TolC bajo condiciones de estrés oxidativo. Rosenberg y colaboradores (134) describen que la inducción de *acrAB* por decanoato es dependiente de RobA y no de MarA ni SoxS en *E. coli*. Sin embargo, el decanoato reduce la expresión de *robA* y activa la expresión de *marA* en *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* (225). En el presente trabajo se describe un modelo de regulación de *acrAB* en respuesta a decanoato similar al descrito en *E. coli*. Este inductor, a diferencia del salicilato, paraquat y tetraciclina no fue capaz de desencadenar un incremento en el perfil de resistencia de la cepa EcDC64 defectiva en *robA*. Además, sólo el gen *robA* se hiperexpresó en respuesta al estrés generado por decanoato, lo que sugiere que RobA media la regulación de la bomba de expulsión multidroga AcrAB-TolC en respuesta a ácidos grasos libres como el decanoato y, aparentemente, ayuda a la supervivencia de *E. cloacae* haciendo que esta bacteria sea más resistente a agentes antimicrobianos.

En resumen, los resultados del presente estudio mostraron que los reguladores SoxS, RobA y RamA, pertenecientes a la familia AraC/XylS, juegan un papel importante en el desarrollo de multirresistencia en *E. cloacae* incrementando la expresión de *acrAB* mediante la unión a su región promotora, lo cual da lugar a un aumento en el perfil de resistencia a antibióticos. Además, se demostró que cada activador es regulado en respuesta a diferentes señales, lo cual desencadena finalmente la inducción de *acrAB*. Por lo tanto, *E. cloacae* puede adaptarse a diferentes condiciones de estrés y desencadenar la emergencia de cepas con un fenotipo MDR.

4.4. Consideraciones finales.

Han pasado más de 60 años desde la introducción en la práctica clínica del primer antibiótico, la penicilina, y a pesar del arsenal antimicrobiano disponible actualmente, las infecciones bacterianas siguen siendo uno de los principales determinantes de mortalidad y morbilidad humana. En la década pasada, el número de antibióticos a los cuales las bacterias han desarrollado resistencia se ha incrementado considerablemente y, como consecuencia, algunos agentes ya no son útiles para el tratamiento de infecciones. El fenómeno de la multirresistencia está frecuentemente asociado con la hiperexpresión de los transportadores que reconocen y expulsan eficazmente al exterior de la célula un amplio rango de compuestos estructuralmente no relacionados, convirtiéndose las bombas de expulsión multidroga en mecanismos relevantes implicados en la resistencia intrínseca y adquirida de las bacterias patógenas.

En el presente trabajo, se ha desarrollado el estudio estructural y funcional de la bomba de expulsión AcrAB-TolC como ejemplo de mecanismo de resistencia capaz de desencadenar un fenotipo de multirresistencia en *E. cloacae*, un microorganismo cuya relevancia clínica se hace cada día más patente dado el alto nivel de resistencia a antibióticos que desarrolla.

En primer lugar se ha demostrado que el sistema de expulsión multidroga AcrAB-TolC de *E. cloacae* está implicado en la resistencia de este microorganismo a agentes antimicrobianos clínicamente relevantes usados para el tratamiento de infecciones humanas. Resulta de interés destacar que este mecanismo puede ser, al menos en parte, el responsable de la resistencia intrínseca de *Enterobacter* a algunos antibióticos usados para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos Gram-positivos, como la oxacilina, linezolid, clindamicina, ácido fusídico, novobiocina y rifampicina.

Por otra parte, se ha demostrado que los componentes de esta bomba de expulsión no sólo están implicados en la resistencia a diferentes antibióticos, sino que también juegan un papel importante en el mantenimiento de la competitividad biológica, además de ser necesarios para preservar intacta la virulencia de *E. cloacae*.

Debido a que el alto nivel de expresión de AcrAB-TolC observado en el aislamiento clínico EcDC64 tiene un papel predominante en la resistencia de este microorganismo a un

amplio rango de antibióticos, colorantes, detergentes y solventes orgánicos, el estudio de su regulación es de gran importancia para entender la acción de estas moléculas en *E. cloacae* y otros organismos relacionados. En el presente trabajo, se ha caracterizado la contribución de los reguladores transcripcionales SoxS, RobA y RamA en el perfil de resistencia de *E. cloacae* a través de la regulación de la bomba de expulsión AcrAB-TolC en respuesta a diferentes estímulos externos. Los resultados de este estudio mostraron que estos reguladores, pertenecientes a la familia AraC/XylS, juegan un papel importante en el desarrollo de resistencia mediada por la bomba de expulsión AcrAB-TolC en *E. cloacae*. Se demostró que estos activadores incrementan la expresión de *acrAB* mediante la unión a su región promotora. Además, se ha observado que *E. cloacae* puede adaptarse a diferentes condiciones de estrés a través de diferentes vías dependiendo del estímulo aplicado, lo cual la hace más resistente a un amplio rango de agentes antimicrobianos.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES.

1. La bomba de expulsión AcrAB-TolC ha sido caracterizada por primera vez en *Enterobacter cloacae* y presenta la misma organización y un alto grado de identidad con su homólogo de *Enterobacter aerogenes*.
2. La bomba de expulsión AcrAB-TolC está implicada en la resistencia que presenta *E. cloacae* EcDC64 a la mayoría de los antibióticos frecuentemente empleados en clínica.
3. La bomba de expulsión AcrAB-TolC de *E. cloacae* no tiene especificidad de sustrato, aunque presenta mayor afinidad por determinadas familias de antibióticos.
4. La bomba de expulsión AcrAB-TolC de *E. cloacae* juega un papel importante en el mantenimiento de la competitividad biológica, además de ser necesaria para preservar intacta la virulencia de *E. cloacae*.
5. La inactivación de *acrA* y *tolC* individualmente tiene un impacto diferente sobre la resistencia, la *fitness* y la virulencia de *E. cloacae*, aunque ambos genes codifican proteínas pertenecientes al mismo sistema de expulsión.
6. Las proteínas reguladoras RamA, SoxS y RobA han sido identificadas y caracterizadas e inducen la expresión de la bomba de expulsión AcrAB-TolC en *E. cloacae*.
7. El nivel de expresión de AcrAB-TolC aumenta en respuesta a diferentes condiciones de estrés provocadas por la presencia de antibióticos y otros compuestos tales como el salicilato, el decanoato o el paraquat.
8. *E. cloacae* es capaz de adaptarse a diferentes condiciones de estrés presentes en el medio hospitalario y de desencadenar la emergencia de cepas con un fenotipo MDR. La activación de la bomba de expulsión AcrAB-TolC tiene lugar a través de diferentes vías dependiendo del estímulo aplicado. Esta versatilidad permite a la bacteria hacerse resistente a un amplio rango de agentes antimicrobianos.

6. REFERENCIAS

6. REFERENCIAS

1. Gilbert P, McBain AJ. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev*2003 Apr;16(2):189-208.
2. Randall LP, Cooles SW, Coldham NG, Penuela EG, Mott AC, Woodward MJ, et al. Commonly used farm disinfectants can select for mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising virulence. *J Antimicrob Chemother*2007 Dec;60(6):1273-80.
3. Sanders WE, Jr., Sanders CC. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol Rev*1997 Apr;10(2):220-41.
4. Murray PR. Manual of Clinical Microbiology. 9TH ed. ASM, editor. Washington D. C. 2007.
5. Mandell GL. Principles and practice of infectious diseases. 6th ed. ELSEVIER, editor. Philadelphia2005.
6. Korfmann G, Wiedemann B. Genetic control of beta-lactamase production in *Enterobacter cloacae*. *Rev Infect Dis*1988 Jul-Aug;10(4):793-9.
7. Chow JW, Fine MJ, Shlaes DM, Quinn JP, Hooper DC, Johnson MP, et al. *Enterobacter* bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Ann Intern Med*1991 Oct 15;115(8):585-90.
8. Diekema DJ, Pfaller MA, Jones RN. Age-related trends in pathogen frequency and antimicrobial susceptibility of bloodstream isolates in North America: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2000. *Int J Antimicrob Agents*2002 Dec;20(6):412-8.
9. Karlowsky JA, Jones ME, Draghi DC, Thornsberry C, Sahm DF, Volturo GA. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the United States in 2002. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*2004 May 10;3:7.
10. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*2004 Aug 1;39(3):309-17.
11. Twum-Danso K, Grant C, al-Suleiman SA, Abdel-Khader S, al-Awami MS, al-Breiki H, et al. Microbiology of postoperative wound infection: a prospective study of 1770 wounds. *J Hosp Infect*1992 May;21(1):29-37.
12. Valles J, Leon C, Alvarez-Lerma F. Nosocomial bacteremia in critically ill patients: a multicenter study evaluating epidemiology and prognosis. Spanish Collaborative Group for Infections in Intensive Care Units of Sociedad Espanola de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias (SEMIUC). *Clin Infect Dis*1997 Mar;24(3):387-95.
13. Wendt C, Messer SA, Hollis RJ, Pfaller MA, Wenzel RP, Herwaldt LA. Recurrent gram-negative bacteremia: incidence and clinical patterns. *Clin Infect Dis*1999 Mar;28(3):611-7.
14. Gordon KA, Jones RN. Susceptibility patterns of orally administered antimicrobials among urinary tract infection pathogens from hospitalized patients in North America: comparison report to Europe and Latin America. Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000). *Diagn Microbiol Infect Dis*2003 Apr;45(4):295-301.
15. Jarvis WR, Martone WJ. Predominant pathogens in hospital infections. *J Antimicrob Chemother*1992 Apr;29 Suppl A:19-24.
16. John JF, Jr., Sharbaugh RJ, Bannister ER. *Enterobacter cloacae*: bacteremia, epidemiology, and antibiotic resistance. *Rev Infect Dis*1982 Jan-Feb;4(1):13-28.
17. Karnad A, Alvarez S, Berk SL. *Enterobacter* pneumonia. *South Med J*1987 May;80(5):601-4.
18. Keller R, Pedroso MZ, Ritchmann R, Silva RM. Occurrence of virulence-associated properties in *Enterobacter cloacae*. *Infect Immun*1998 Feb;66(2):645-9.

19. Barnes AI, Paraje MG, del CBP, Albasa I. Molecular properties and metabolic effect on blood cells produced by a new toxin of *Enterobacter cloacae*. *Cell Biol Toxicol*2001;17(6):409-18.
20. Navarre WW, Zychlinsky A. Pathogen-induced apoptosis of macrophages: a common end for different pathogenic strategies. *Cell Microbiol*2000 Aug;2(4):265-73.
21. Krzyminska S, Mokracka J, Koczura R, Kaznowski A. Cytotoxic activity of *Enterobacter cloacae* human isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol*2009 Aug;56(3):248-52.
22. Paraje MG, Barnes AI, Albasa I. An *Enterobacter cloacae* toxin able to generate oxidative stress and to provoke dose-dependent lysis of leukocytes. *Int J Med Microbiol*2005 Jun;295(2):109-16.
23. Ghosh P. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev*2004 Dec;68(4):771-95.
24. Stuber K, Frey J, Burnens AP, Kuhnert P. Detection of type III secretion genes as a general indicator of bacterial virulence. *Mol Cell Probes*2003 Feb;17(1):25-32.
25. Cornelis GR. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol*2006 Nov;4(11):811-25.
26. Mokracka J, Koczura R, Kaznowski A. Yersiniabactin and other siderophores produced by clinical isolates of *Enterobacter* spp. and *Citrobacter* spp. *FEMS Immunol Med Microbiol*2004 Jan 15;40(1):51-5.
27. Raymond KN, Dertz EA, Kim SS. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*2003 Apr 1;100(7):3584-8.
28. Visca P, Filetici E, Anastoasio MP, Vetriani C, Fantasia M, Orsi N. Siderophore production by *Salmonella* species isolated from different sources. *FEMS Microbiol Lett*1991 Apr 15;63(2-3):225-31.
29. Brock JH, Williams PH, Liceaga J, Wooldridge KG. Relative availability of transferrin-bound iron and cell-derived iron to aerobactin-producing and enterochelin-producing strains of *Escherichia coli* and to other microorganisms. *Infect Immun*1991 Sep;59(9):3185-90.
30. Perry RD, Balbo PB, Jones HA, Fetherston JD, DeMoll E. Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. *Microbiology*1999 May;145 (Pt 5):1181-90.
31. Bach S, de Almeida A, Carniel E. The Yersinia high-pathogenicity island is present in different members of the family Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Lett*2000 Feb 15;183(2):289-94.
32. Van Tiel-Menkveld GJ, Mentjox-Vervuurt JM, Oudega B, de Graaf FK. Siderophore production by *Enterobacter cloacae* and a common receptor protein for the uptake of aerobactin and cloacin DF13. *J Bacteriol*1982 May;150(2):490-7.
33. Sanders CC. beta-Lactamases of gram-negative bacteria: new challenges for new drugs. *Clin Infect Dis*1992 May;14(5):1089-99.
34. Llarrull LI, Testero SA, Fisher JF, Mobashery S. The future of the beta-lactams. *Curr Opin Microbiol* Oct;13(5):551-7.
35. Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J*1991 May 15;276 (Pt 1):269-70.
36. Canton R, Oliver A, Coque TM, Varela Mdel C, Perez-Diaz JC, Baquero F. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol*2002 Apr;40(4):1237-43.
37. De Gheldre Y, Struelens MJ, Glupczynski Y, De Mol P, Maes N, Nonhoff C, et al. National epidemiologic surveys of *Enterobacter aerogenes* in Belgian hospitals from 1996 to 1998. *J Clin Microbiol*2001 Mar;39(3):889-96.
38. Szabo D, Melan MA, Hujer AM, Bonomo RA, Hujer KM, Bethel CR, et al. Molecular analysis of the simultaneous production of two SHV-type extended-spectrum beta-lactamases in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* by using single-nucleotide polymorphism genotyping. *Antimicrob Agents Chemother*2005 Nov;49(11):4716-20.

39. Yu WL, Cheng KC, Chi CJ, Chen HE, Chuang YC, Wu LT. Characterisation and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* isolated from a district teaching hospital in Taiwan. Clin Microbiol Infect 2006 Jun;12(6):579-82.
40. Machado E, Ferreira J, Novais A, Peixe L, Canton R, Baquero F, et al. Preservation of integron types among Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases in a Spanish hospital over a 15-year period (1988 to 2003). Antimicrob Agents Chemother 2007 Jun;51(6):2201-4.
41. Fernandez A, Pereira MJ, Suarez JM, Poza M, Trevino M, Villalon P, et al. Emergence in Spain of a multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* clinical isolate producing SFO-1 extended-spectrum beta-lactamase. J Clin Microbiol Mar;49(3):822-8.
42. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev 2005 Apr;18(2):306-25.
43. Deshpande LM, Jones RN, Fritsche TR, Sader HS. Occurrence and characterization of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000-2004). Microb Drug Resist 2006 Winter;12(4):223-30.
44. Tato M, Coque TM, Ruiz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J, Sader HS, et al. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of Enterobacteriaceae infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain: toward endemicity? Clin Infect Dis 2007 Nov 1;45(9):1171-8.
45. Souli M, Kontopidou FV, Koratzanis E, Antoniadou A, Giannitsioti E, Evangelopoulou P, et al. In vitro activity of tigecycline against multiple-drug-resistant, including pan-resistant, gram-negative and gram-positive clinical isolates from Greek hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2006 Sep;50(9):3166-9.
46. Trevino M, Moldes L, Martinez-Lamas L, Varon C, Regueiro BJ. Carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* and the emergence of metallo-beta-lactamase-producing strains in a third-level hospital (Santiago de Compostela, NW Spain). Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009 Oct;28(10):1253-8.
47. Beceiro A, Bou, G. AmpC β -lactamases: an increasing problem worldwide. Reviews in Medical Microbiology 2004;15:141-52.
48. Livermore DM. Mechanisms of resistance to cephalosporin antibiotics. Drugs 1987;34 Suppl 2:64-88.
49. Moya B, Dotsch A, Juan C, Blazquez J, Zamorano L, Haussler S, et al. Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. PLoS Pathog 2009 Mar;5(3):e1000353.
50. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995 Jun;39(6):1211-33.
51. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2004 Jan;48(1):15-22.
52. García JA. Antimicrobianos en medicina. 2 ed. Barcelona: Prous Science; 2006.
53. Grkovic S, Brown MH, Skurray RA. Regulation of bacterial drug export systems. Microbiol Mol Biol Rev 2002 Dec;66(4):671-701, table of contents.
54. Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps. Biochem Pharmacol 2000 Aug 15;60(4):457-70.
55. McMurry L, Petrucci RE, Jr., Levy SB. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 1980 Jul;77(7):3974-7.
56. Ball PR, Shales SW, Chopra I. Plasmid-mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli* involves increased efflux of the antibiotic. Biochem Biophys Res Commun 1980 Mar 13;93(1):74-81.
57. Benveniste R, Davies J. Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 1973 Aug;70(8):2276-80.
58. Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. Science 1994 Apr 15;264(5157):375-82.

59. Davies JE. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. Ciba Found Symp1997;207:15-27; discussion -35.
60. George AM, Levy SB. Gene in the major cotransduction gap of the *Escherichia coli* K-12 linkage map required for the expression of chromosomal resistance to tetracycline and other antibiotics. J Bacteriol1983 Aug;155(2):541-8.
61. George AM, Levy SB. Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol, and other antibiotics in *Escherichia coli*: involvement of a non-plasmid-determined efflux of tetracycline. J Bacteriol1983 Aug;155(2):531-40.
62. Saier MH, Jr., Paulsen IT, Sliwinski MK, Pao SS, Skurray RA, Nikaido H. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. FASEB J1998 Mar;12(3):265-74.
63. Paulsen IT, Chen J, Nelson KE, Saier MH, Jr. Comparative genomics of microbial drug efflux systems. J Mol Microbiol Biotechnol2001 Apr;3(2):145-50.
64. Ninio S, Schuldiner S. Characterization of an archaeal multidrug transporter with a unique amino acid composition. J Biol Chem2003 Apr 4;278(14):12000-5.
65. Gbelska Y, Krijger JJ, Breunig KD. Evolution of gene families: the multidrug resistance transporter genes in five related yeast species. FEMS Yeast Res2006 May;6(3):345-55.
66. Stavrovskaya AA, Stromskaya TP. Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells. Biochemistry (Mosc)2008 May;73(5):592-604.
67. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochim Biophys Acta1976 Nov 11;455(1):152-62.
68. Kartner N, Riordan JR, Ling V. Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. Science1983 Sep 23;221(4617):1285-8.
69. Poole K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. Ann Med2007;39(3):162-76.
70. Pang Y, Brown BA, Steingrube VA, Wallace RJ, Jr., Roberts MC. Tetracycline resistance determinants in *Mycobacterium* and *Streptomyces* species. Antimicrob Agents Chemother1994 Jun;38(6):1408-12.
71. D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. Sampling the antibiotic resistome. Science2006 Jan 20;311(5759):374-7.
72. Wright GD. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. Nat Rev Microbiol2007 Mar;5(3):175-86.
73. Alonso A, Rojo F, Martinez JL. Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. Environ Microbiol1999 Oct;1(5):421-30.
74. Konstantinidis KT, Tiedje JM. Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. Proc Natl Acad Sci U S A2004 Mar 2;101(9):3160-5.
75. Saier MH, Jr., Paulsen IT. Phylogeny of multidrug transporters. Semin Cell Dev Biol2001 Jun;12(3):205-13.
76. Ren Q, Kang KH, Paulsen IT. TransportDB: a relational database of cellular membrane transport systems. Nucleic Acids Res2004 Jan 1;32(Database issue):D284-8.
77. Paulsen IT. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. Curr Opin Microbiol2003 Oct;6(5):446-51.
78. Piddock LJ. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. Nat Rev Microbiol2006 Aug;4(8):629-36.
79. Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. Annu Rev Cell Biol1992;8:67-113.
80. Higgins CF, Hiles ID, Salmond GP, Gill DR, Downie JA, Evans IJ, et al. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. Nature1986 Oct 2-8;323(6087):448-50.
81. Rosenberg MF, Velarde G, Ford RC, Martin C, Berridge G, Kerr ID, et al. Repacking of the

transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. *EMBO J*2001 Oct 15;20(20):5615-25.

82. Dong J, Yang G, McHaourab HS. Structural basis of energy transduction in the transport cycle of MsbA. *Science*2005 May 13;308(5724):1023-8.

83. Dey S, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM, Ambudkar SV. Evidence for two nonidentical drug-interaction sites in the human P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*1997 Sep 30;94(20):10594-9.

84. Martin C, Berridge G, Mistry P, Higgins C, Charlton P, Callaghan R. Drug binding sites on P-glycoprotein are altered by ATP binding prior to nucleotide hydrolysis. *Biochemistry*2000 Oct 3;39(39):11901-6.

85. Martin C, Higgins CF, Callaghan R. The vinblastine binding site adopts high- and low-affinity conformations during a transport cycle of P-glycoprotein. *Biochemistry*2001 Dec 25;40(51):15733-42.

86. Payen LF, Gao M, Westlake CJ, Cole SP, Deeley RG. Role of carboxylate residues adjacent to the conserved core Walker B motifs in the catalytic cycle of multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *J Biol Chem*2003 Oct 3;278(40):38537-47.

87. Yin Y, He X, Szewczyk P, Nguyen T, Chang G. Structure of the multidrug transporter EmrD from *Escherichia coli*. *Science*2006 May 5;312(5774):741-4.

88. Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev*2006 Apr;19(2):382-402.

89. Schuldiner S, Lebediker M, Yerushalmi H. EmrE, the smallest ion-coupled transporter, provides a unique paradigm for structure-function studies. *J Exp Biol*1997 Jan;200(Pt 2):335-41.

90. Ma D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, Nikaido H, Hearst JE. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*1993 Oct;175(19):6299-313.

91. Aires JR, Kohler T, Nikaido H, Plesiat P. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*1999 Nov;43(11):2624-8.

92. Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J Bacteriol*1996 Oct;178(20):5853-9.

93. Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*1994 Apr 15;264(5157):382-8.

94. Vaara M. Antibiotic-supersusceptible mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob Agents Chemother*1993 Nov;37(11):2255-60.

95. Nikaido H, Basina M, Nguyen V, Rosenberg EY. Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those beta-lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *J Bacteriol*1998 Sep;180(17):4686-92.

96. Berlanga M, Vazquez JL, Hernandez-Borrell J, Montero MT, Vinas M. Evidence of an efflux pump in *Serratia marcescens*. *Microb Drug Resist*2000 Summer;6(2):111-7.

97. Kumar A, Worobec EA. Fluoroquinolone resistance of *Serratia marcescens*: involvement of a proton gradient-dependent efflux pump. *J Antimicrob Chemother*2002 Oct;50(4):593-6.

98. Linde HJ, Notka F, Irtenkauf C, Decker J, Wild J, Niller HH, et al. Increase in MICs of ciprofloxacin *in vivo* in two closely related clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother*2002 Apr;49(4):625-30.

99. Linde HJ, Notka F, Metz M, Kochanowski B, Heisig P, Lehn N. In vivo increase in resistance to ciprofloxacin in *Escherichia coli* associated with deletion of the C-terminal part of MarR. *Antimicrob Agents Chemother*2000 Jul;44(7):1865-8.

100. Mallea M, Chevalier J, Bornet C, Eyraud A, Davin-Regli A, Bollet C, et al. Porin alteration and active efflux: two *in vivo* drug resistance strategies used by *Enterobacter aerogenes*. *Microbiology*1998 Nov;144 (Pt 11):3003-9.

101. Mazzariol A, Zuliani J, Cornaglia G, Rossolini GM, Fontana R. AcrAB Efflux System: Expression and Contribution to Fluoroquinolone Resistance in *Klebsiella* spp. *Antimicrob Agents Chemother*2002

Dec;46(12):3984-6.

102. Mazzariol A, Tokue Y, Kanegawa TM, Cornaglia G, Nikaido H. High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA. *Antimicrob Agents Chemother*2000 Dec;44(12):3441-3.

103. Pradel E, Pages JM. The AcrAB-TolC efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*2002 Aug;46(8):2640-3.

104. Visalli MA, Murphy E, Projan SJ, Bradford PA. AcrAB multidrug efflux pump is associated with reduced levels of susceptibility to tigecycline (GAR-936) in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*2003 Feb;47(2):665-9.

105. Aires JR, Nikaido H. Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*2005 Mar;187(6):1923-9.

106. Eswaran J, Koronakis E, Higgins MK, Hughes C, Koronakis V. Three's company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Curr Opin Struct Biol*2004 Dec;14(6):741-7.

107. Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Yamaguchi A. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature*2002 Oct 10;419(6907):587-93.

108. Nikaido H. Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*;77:1-60.

109. Seeger MA, Schiefner A, Eicher T, Verrey F, Diederichs K, Pos KM. Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism. *Science*2006 Sep 1;313(5791):1295-8.

110. Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Matsumoto T, Yamaguchi A. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature*2006 Sep 14;443(7108):173-9.

111. Sennhauser G, Amstutz P, Briand C, Storchenegger O, Grutter MG. Drug export pathway of multidrug exporter AcrB revealed by DARPIn inhibitors. *PLoS Biol*2007 Jan;5(1):e7.

112. Seeger MA, von Ballmoos C, Eicher T, Brandstatter L, Verrey F, Diederichs K, et al. Engineered disulfide bonds support the functional rotation mechanism of multidrug efflux pump AcrB. *Nat Struct Mol Biol*2008 Feb;15(2):199-205.

113. Takatsuka Y, Nikaido H. Covalently linked trimer of the AcrB multidrug efflux pump provides support for the functional rotating mechanism. *J Bacteriol*2009 Mar;191(6):1729-37.

114. Yu EW, McDermott G, Zgurskaya HI, Nikaido H, Koshland DE, Jr. Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump. *Science*2003 May 9;300(5621):976-80.

115. Yu EW, Aires JR, McDermott G, Nikaido H. A periplasmic drug-binding site of the AcrB multidrug efflux pump: a crystallographic and site-directed mutagenesis study. *J Bacteriol*2005 Oct;187(19):6804-15.

116. Elkins CA, Nikaido H. Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops. *J Bacteriol*2002 Dec;184(23):6490-8.

117. Tikhonova EB, Wang Q, Zgurskaya HI. Chimeric analysis of the multicomponent multidrug efflux transporters from gram-negative bacteria. *J Bacteriol*2002 Dec;184(23):6499-507.

118. Bohnert JA, Schuster S, Seeger MA, Fahnrich E, Pos KM, Kern WV. Site-directed mutagenesis reveals putative substrate binding residues in the *Escherichia coli* RND efflux pump AcrB. *J Bacteriol*2008 Dec;190(24):8225-9.

119. Wehmeier C, Schuster S, Fahnrich E, Kern WV, Bohnert JA. Site-directed mutagenesis reveals amino acid residues in the *Escherichia coli* RND efflux pump AcrB that confer macrolide resistance. *Antimicrob Agents Chemother*2009 Jan;53(1):329-30.

120. Mikolosko J, Bobyk K, Zgurskaya HI, Ghosh P. Conformational flexibility in the multidrug efflux system protein AcrA. *Structure*2006 Mar;14(3):577-87.

121. Ip H, Stratton K, Zgurskaya H, Liu J. pH-induced conformational changes of AcrA, the membrane fusion protein of *Escherichia coli* multidrug efflux system. *J Biol Chem*2003 Dec 12;278(50):50474-82.

122. Higgins MK, Bokma E, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V. Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. *Proc Natl Acad Sci U S A*2004 Jul 6;101(27):9994-9.
123. Symmons MF, Bokma E, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V. The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *Proc Natl Acad Sci U S A*2009 Apr 28;106(17):7173-8.
124. Koronakis V, Sharff A, Koronakis E, Luisi B, Hughes C. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*2000 Jun 22;405(6789):914-9.
125. Tamura N, Murakami S, Oyama Y, Ishiguro M, Yamaguchi A. Direct interaction of multidrug efflux transporter AcrB and outer membrane channel TolC detected via site-directed disulfide cross-linking. *Biochemistry*2005 Aug 23;44(33):11115-21.
126. Elkins CA, Nikaido H. Chimeric analysis of AcrA function reveals the importance of its C-terminal domain in its interaction with the AcrB multidrug efflux pump. *J Bacteriol*2003 Sep;185(18):5349-56.
127. Lobedanz S, Bokma E, Symmons MF, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V. A periplasmic coiled-coil interface underlying TolC recruitment and the assembly of bacterial drug efflux pumps. *Proc Natl Acad Sci U S A*2007 Mar 13;104(11):4612-7.
128. Ma D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, Nikaido H, Hearst JE. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*1995 Apr;16(1):45-55.
129. Nakajima H, Kobayashi K, Kobayashi M, Asako H, Aono R. Overexpression of the *robA* gene increases organic solvent tolerance and multiple antibiotic and heavy metal ion resistance in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*1995 Jun;61(6):2302-7.
130. White DG, Goldman JD, Demple B, Levy SB. Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*1997 Oct;179(19):6122-6.
131. Ma D, Alberti M, Lynch C, Nikaido H, Hearst JE. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol Microbiol*1996 Jan;19(1):101-12.
132. Alekshun MN, Levy SB. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrob Agents Chemother*1997 Oct;41(10):2067-75.
133. Randall LP, Woodward MJ. The multiple antibiotic resistance (*mar*) locus and its significance. *Res Vet Sci*2002 Apr;72(2):87-93.
134. Rosenberg EY, Bertenthal D, Nilles ML, Bertrand KP, Nikaido H. Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. *Mol Microbiol*2003 Jun;48(6):1609-19.
135. Martin RG, Rosner JL. Genomics of the *marA/soxS/rob* regulon of *Escherichia coli*: identification of directly activated promoters by application of molecular genetics and informatics to microarray data. *Mol Microbiol*2002 Jun;44(6):1611-24.
136. Martin RG, Rosner JL. Analysis of microarray data for the *marA*, *soxS*, and *rob* regulons of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*2003;370:278-80.
137. George AM, Hall RM, Stokes HW. Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae*: a novel gene, *ramA*, confers a multidrug resistance phenotype in *Escherichia coli*. *Microbiology*1995 Aug;141 (Pt 8):1909-20.
138. Ma D, Cook DN, Hearst JE, Nikaido H. Efflux pumps and drug resistance in gram-negative bacteria. *Trends Microbiol*1994 Dec;2(12):489-93.
139. Pan W, Spratt BG. Regulation of the permeability of the gonococcal cell envelope by the *mtr* system. *Mol Microbiol*1994 Feb;11(4):769-75.
140. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*2004;64(2):159-204.
141. Olliver A, Valle M, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A. Role of an *acrR* mutation in multidrug resistance of *in vitro*-selected fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *FEMS Microbiol Lett*2004 Sep 1;238(1):267-72.
142. Webber MA, Piddock LJ. Absence of mutations in *marRAB* or *soxRS* in *acrB*-overexpressing

fluoroquinolone-resistant clinical and veterinary isolates of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 2001 May;45(5):1550-2.

143. Webber MA, Talukder A, Piddock LJ. Contribution of mutation at amino acid 45 of AcrR to *acrB* expression and ciprofloxacin resistance in clinical and veterinary *Escherichia coli* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2005 Oct;49(10):4390-2.

144. Kanamaru K, Tatsuno I, Tobe T, Sasakawa C. SdiA, an *Escherichia coli* homologue of quorum-sensing regulators, controls the expression of virulence factors in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Mol Microbiol 2000 Nov;38(4):805-16.

145. Gallegos MT, Schleif R, Bairoch A, Hofmann K, Ramos JL. Arac/XylS family of transcriptional regulators. Microbiol Mol Biol Rev 1997 Dec;61(4):393-410.

146. Martin RG, Gillette WK, Rosner JL. Promoter discrimination by the related transcriptional activators MarA and SoxS: differential regulation by differential binding. Mol Microbiol 2000 Feb;35(3):623-34.

147. Miller PF, Gambino LF, Sulavik MC, Gracheck SJ. Genetic relationship between *soxRS* and *mar* loci in promoting multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1994 Aug;38(8):1773-9.

148. Martin RG, Gillette WK, Rhee S, Rosner JL. Structural requirements for *marbox* function in transcriptional activation of *mar/sox/rob* regulon promoters in *Escherichia coli*: sequence, orientation and spatial relationship to the core promoter. Mol Microbiol 1999 Nov;34(3):431-41.

149. Martin RG, Jair KW, Wolf RE, Jr., Rosner JL. Autoactivation of the *marRAB* multiple antibiotic resistance operon by the MarA transcriptional activator in *Escherichia coli*. J Bacteriol 1996 Apr;178(8):2216-23.

150. Rhee S, Martin RG, Rosner JL, Davies DR. A novel DNA-binding motif in MarA: the first structure for an AraC family transcriptional activator. Proc Natl Acad Sci U S A 1998 Sep 1;95(18):10413-8.

151. Demple B. Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* *soxRS* oxidative stress regulon—a review. Gene 1996 Nov 7;179(1):53-7.

152. Martin RG, Rosner JL. Fis, an accessory factor for transcriptional activation of the *mar* (multiple antibiotic resistance) promoter of *Escherichia coli* in the presence of the activator MarA, SoxS, or Rob. J Bacteriol 1997 Dec;179(23):7410-9.

153. Tanaka T, Horii T, Shibayama K, Sato K, Ohsuka S, Arakawa Y, et al. RobA-induced multiple antibiotic resistance largely depends on the activation of the AcrAB efflux. Microbiol Immunol 1997;41(9):697-702.

154. Kwon HJ, Bennik MH, Demple B, Ellenberger T. Crystal structure of the *Escherichia coli* Rob transcription factor in complex with DNA. Nat Struct Biol 2000 May;7(5):424-30.

155. Delihias N, Forst S. MicF: an antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors. J Mol Biol 2001 Oct 12;313(1):1-12.

156. Okusu H, Ma D, Nikaido H. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. J Bacteriol 1996 Jan;178(1):306-8.

157. Koutsolioutsou A, Martins EA, White DG, Levy SB, Demple B. A *soxRS*-constitutive mutation contributing to antibiotic resistance in a clinical isolate of *Salmonella enterica* (Seroovar *typhimurium*). Antimicrob Agents Chemother 2001 Jan;45(1):38-43.

158. Jellen-Ritter AS, Kern WV. Enhanced expression of the multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF associated with insertion element transposition in *Escherichia coli* mutants Selected with a fluoroquinolone. Antimicrob Agents Chemother 2001 May;45(5):1467-72.

159. Koutsolioutsou A, Pena-Llopis S, Demple B. Constitutive *soxR* mutations contribute to multiple-antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2005 Jul;49(7):2746-52.

160. Oethinger M, Podglajen I, Kern WV, Levy SB. Overexpression of the *marA* or *soxS* regulatory gene in clinical topoisomerase mutants of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1998 Aug;42(8):2089-94.

161. Rosenblum R, Khan E, Gonzalez G, Hasan R, Schneiders T. Genetic regulation of the *ramA* locus and its expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents* Jul;38(1):39-45.
162. Ruzin A, Visalli MA, Keeney D, Bradford PA. Influence of transcriptional activator RamA on expression of multidrug efflux pump AcrAB and tigecycline susceptibility in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Mar;49(3):1017-22.
163. Schneiders T, Amyes SG, Levy SB. Role of AcrR and *ramA* in fluoroquinolone resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Singapore. *Antimicrob Agents Chemother* 2003 Sep;47(9):2831-7.
164. Hentschke M, Wolters M, Sobottka I, Rohde H, Aepfelbacher M. *ramR* mutations in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother* Jun;54(6):2720-3.
165. Abouzeed YM, Baucheron S, Cloeckaert A. *ramR* mutations involved in efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008 Jul;52(7):2428-34.
166. Chollet R, Chevalier J, Bollet C, Pages JM, Davin-Regli A. RamA is an alternate activator of the multidrug resistance cascade in *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Jul;48(7):2518-23.
167. van der Straaten T, Janssen R, Mevius DJ, van Dissel JT. *Salmonella* gene *rma* (*ramA*) and multiple-drug-resistant *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Jun;48(6):2292-4.
168. Markham PN, Neyfakh AA. Inhibition of the multidrug transporter NorA prevents emergence of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996 Nov;40(11):2673-4.
169. Markham PN. Inhibition of the emergence of ciprofloxacin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by the multidrug efflux inhibitor reserpine. *Antimicrob Agents Chemother* 1999 Apr;43(4):988-9.
170. Markham PN, Westhaus E, Klyachko K, Johnson ME, Neyfakh AA. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999 Oct;43(10):2404-8.
171. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 Jan;45(1):105-16.
172. Baucheron S, Imberechts H, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A. The AcrB multidrug transporter plays a major role in high-level fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* phage type DT204. *Microb Drug Resist* 2002 Winter;8(4):281-9.
173. Ricci V, Tzakas P, Buckley A, Piddock LJ. Ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* strains are difficult to select in the absence of AcrB and TolC. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 Jan;50(1):38-42.
174. Martinez JL, Sanchez MB, Martinez-Solano L, Hernandez A, Garmendia L, Fajardo A, et al. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 2009 Mar;33(2):430-49.
175. Begley M, Gahan CG, Hill C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev* 2005 Sep;29(4):625-51.
176. Drake DR, Brogden KA, Dawson DV, Wertz PW. Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface. *J Lipid Res* 2008 Jan;49(1):4-11.
177. Laube DM, Yim S, Ryan LK, Kisich KO, Diamond G. Antimicrobial peptides in the airway. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;306:153-82.
178. Lacroix FJ, Cloeckaert A, Grepinet O, Pinault C, Popoff MY, Waxin H, et al. *Salmonella typhimurium* *acrB*-like gene: identification and role in resistance to biliary salts and detergents and in murine infection. *FEMS Microbiol Lett* 1996 Jan 15;135(2-3):161-7.
179. Bina XR, Lavine CL, Miller MA, Bina JE. The AcrAB RND efflux system from the live vaccine strain of *Francisella tularensis* is a multiple drug efflux system that is required for virulence in mice. *FEMS Microbiol Lett* 2008 Feb;279(2):226-33.

180. Lin J, Sahin O, Michel LO, Zhang Q. Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and *in vivo* colonization of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun*2003 Aug;71(8):4250-9.
181. Lee EH, Shafer WM. The *farAB*-encoded efflux pump mediates resistance of gonococci to long-chained antibacterial fatty acids. *Mol Microbiol*1999 Aug;33(4):839-45.
182. Jerse AE, Sharma ND, Simms AN, Crow ET, Snyder LA, Shafer WM. A gonococcal efflux pump system enhances bacterial survival in a female mouse model of genital tract infection. *Infect Immun*2003 Oct;71(10):5576-82.
183. Bengoechea JA, Skurnik M. Temperature-regulated efflux pump/potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*. *Mol Microbiol*2000 Jul;37(1):67-80.
184. Bhakdi S, Mackman N, Menestrina G, Gray L, Hugo F, Seeger W, et al. The hemolysin of *Escherichia coli*. *Eur J Epidemiol*1988 Jun;4(2):135-43.
185. Gilson L, Mahanty HK, Kolter R. Genetic analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V. *EMBO J*1990 Dec;9(12):3875-84.
186. Bina JE, Mekalanos JJ. *Vibrio cholerae tolC* is required for bile resistance and colonization. *Infect Immun*2001 Jul;69(7):4681-5.
187. Boardman BK, Satchell KJ. *Vibrio cholerae* strains with mutations in an atypical type I secretion system accumulate RTX toxin intracellularly. *J Bacteriol*2004 Dec;186(23):8137-43.
188. Hirakata Y, Srikumar R, Poole K, Gotoh N, Suematsu T, Kohno S, et al. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Exp Med*2002 Jul 1;196(1):109-18.
189. Join-Lambert OF, Michea-Hamzehpour M, Kohler T, Chau F, Faurisson F, Dautrey S, et al. Differential selection of multidrug efflux mutants by trovafloxacin and ciprofloxacin in an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* acute pneumonia in rats. *Antimicrob Agents Chemother*2001 Feb;45(2):571-6.
190. Lee DG, Urbach JM, Wu G, Liberati NT, Feinbaum RL, Miyata S, et al. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol*2006;7(10):R90.
191. Barbosa TM, Levy SB. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *J Bacteriol*2000 Jun;182(12):3467-74.
192. Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*2004 Jan;10(1):12-26.
193. Nikaido H. Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin Infect Dis*1998 Aug;27 Suppl 1:S32-41.
194. Nikaido H, Zgurskaya HI. Antibiotic efflux mechanisms. *Curr Opin Infect Dis*1999 Dec;12(6):529-36.
195. Baucheron S, Tyler S, Boyd D, Mulvey MR, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A. AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother*2004 Oct;48(10):3729-35.
196. Kobayashi N, Nishino K, Yamaguchi A. Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*2001 Oct;183(19):5639-44.
197. Schumacher A, Trittler R, Bohnert JA, Kummerer K, Pages JM, Kern WV. Intracellular accumulation of linezolid in *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Enterobacter aerogenes*: role of enhanced efflux pump activity and inactivation. *J Antimicrob Chemother*2007 Jun;59(6):1261-4.
198. Keeney D, Ruzin A, Bradford PA. RamA, a transcriptional regulator, and AcrAB, an RND-type efflux pump, are associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Enterobacter cloacae*. *Microb Drug Resist*2007 Spring;13(1):1-6.
199. Perez A, Canle D, Latasa C, Poza M, Beceiro A, Tomas Mdel M, et al. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the AcrAB-TolC efflux pump of *Enterobacter cloacae* and determination of its involvement in antibiotic resistance in a clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*2007 Sep;51(9):3247-53.
200. Blair JM, La Ragione RM, Woodward MJ, Piddock LJ. Periplasmic adaptor protein AcrA has a distinct role in the antibiotic resistance and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J*

Antimicrob Chemother 2009 Nov;64(5):965-72.

201. Buckley AM, Webber MA, Cooles S, Randall LP, La Ragione RM, Woodward MJ, et al. The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. Cell Microbiol 2006 May;8(5):847-56.

202. Burse A, Weingart H, Ullrich MS. The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. Mol Plant Microbe Interact 2004 Jan;17(1):43-54.

203. Bunikis I, Denker K, Ostberg Y, Andersen C, Benz R, Bergstrom S. An RND-type efflux system in *Borrelia burgdorferi* is involved in virulence and resistance to antimicrobial compounds. PLoS Pathog 2008 Feb;4(2):e1000009.

204. Gil H, Platz GJ, Forestal CA, Monfett M, Bakshi CS, Sellati TJ, et al. Deletion of TolC orthologs in *Francisella tularensis* identifies roles in multidrug resistance and virulence. Proc Natl Acad Sci U S A 2006 Aug 22;103(34):12897-902.

205. Martins A, Spengler G, Rodrigues L, Viveiros M, Ramos J, Martins M, et al. pH Modulation of efflux pump activity of multi-drug resistant *Escherichia coli*: protection during its passage and eventual colonization of the colon. PLoS One 2009;4(8):e6656.

206. Nishino K, Latifi T, Groisman EA. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Mol Microbiol 2006 Jan;59(1):126-41.

207. Padilla E, Llobet E, Domenech-Sanchez A, Martinez-Martinez L, Bengoechea JA, Alberti S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. Antimicrob Agents Chemother Jan;54(1):177-83.

208. Warner DM, Shafer WM, Jerse AE. Clinically relevant mutations that cause derepression of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrC-MtrD-MtrE Efflux pump system confer different levels of antimicrobial resistance and *in vivo* fitness. Mol Microbiol 2008 Oct;70(2):462-78.

209. Grkovic S, Brown MH, Skurray RA. Transcriptional regulation of multidrug efflux pumps in bacteria. Semin Cell Dev Biol 2001 Jun;12(3):225-37.

210. Perez A, Poza M, Fernandez A, Fernandez MD, Mallo S, Merino M, et al. Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness and virulence of *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother Jan 30.

211. Bennik MH, Pomposiello PJ, Thorne DF, Demple B. Defining a *rob* regulon in *Escherichia coli* by using transposon mutagenesis. J Bacteriol 2000 Jul;182(13):3794-801.

212. Bialek-Davenet S, Marcon E, Leflon-Guibout V, Lavigne JP, Bert F, Moreau R, et al. In vitro selection of *ramR* and *soxR* mutants overexpressing efflux systems by fluoroquinolones as well as cefoxitin in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother Jun;55(6):2795-802.

213. Bratu S, Landman D, George A, Salvani J, Quale J. Correlation of the expression of *acrB* and the regulatory genes *marA*, *soxS* and *ramA* with antimicrobial resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* endemic to New York City. J Antimicrob Chemother 2009 Aug;64(2):278-83.

214. Fabrega A, Martin RG, Rosner JL, Tavio MM, Vila J. Constitutive SoxS expression in a fluoroquinolone-resistant strain with a truncated SoxR protein and identification of a new member of the *marA-soxS-rob* regulon, *mdtG*. Antimicrob Agents Chemother Mar;54(3):1218-25.

215. Kehrenberg C, Cloeckert A, Klein G, Schwarz S. Decreased fluoroquinolone susceptibility in mutants of *Salmonella* serovars other than Typhimurium: detection of novel mutations involved in modulated expression of *ramA* and *soxS*. J Antimicrob Chemother 2009 Dec;64(6):1175-80.

216. Lee EH, Collatz E, Podglajen I, Gutmann L. A *rob*-like gene of *Enterobacter cloacae* affecting porin synthesis and susceptibility to multiple antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1996 Sep;40(9):2029-33.

217. O'Regan E, Quinn T, Pages JM, McCusker M, Piddock L, Fanning S. Multiple regulatory pathways associated with high-level ciprofloxacin and multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar enteritidis: involvement of RamA and other global regulators. Antimicrob Agents Chemother 2009 Mar;53(3):1080-7.

218. Zheng J, Cui S, Meng J. Effect of transcriptional activators RamA and SoxS on expression of multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF in fluoroquinolone-resistant *Salmonella Typhimurium*. J

Antimicrob Chemother 2009 Jan;63(1):95-102.

219. Hornsey M, Ellington MJ, Doumith M, Scott G, Livermore DM, Woodford N. Emergence of AcrAB-mediated tigecycline resistance in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* during ciprofloxacin treatment. Int J Antimicrob Agents May;35(5):478-81.

220. Skarstad K, Thony B, Hwang DS, Kornberg A. A novel binding protein of the origin of the *Escherichia coli* chromosome. J Biol Chem 1993 Mar 15;268(8):5365-70.

221. Rosner JL, Dangi B, Gronenborn AM, Martin RG. Posttranscriptional activation of the transcriptional activator Rob by dipyrindyl in *Escherichia coli*. J Bacteriol 2002 Mar;184(5):1407-16.

222. Viveiros M, Jesus A, Brito M, Leandro C, Martins M, Ordway D, et al. Inducement and reversal of tetracycline resistance in *Escherichia coli* K-12 and expression of proton gradient-dependent multidrug efflux pump genes. Antimicrob Agents Chemother 2005 Aug;49(8):3578-82.

223. Seoane AS, Levy SB. Characterization of MarR, the repressor of the multiple antibiotic resistance (*mar*) operon in *Escherichia coli*. J Bacteriol 1995 Jun;177(12):3414-9.

224. Viveiros M, Dupont M, Rodrigues L, Couto I, Davin-Regli A, Martins M, et al. Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. PLoS One 2007;2(4):e365.

225. Hartog E, Ben-Shalom L, Shachar D, Matthews KR, Yaron S. Regulation of *marA*, *soxS*, *rob*, *acrAB* and *micF* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Microbiol Immunol 2008 Dec;52(12):565-74.

226. Michan C, Manchado M, Pueyo C. SoxRS down-regulation of *rob* transcription. J Bacteriol 2002 Sep;184(17):4733-8.

7. ANEXOS

7.1. Artículo capítulo I.

Cloning, Nucleotide Sequencing, and Analysis of the AcrAB-TolC Efflux Pump of *Enterobacter cloacae* and Determination of Its Involvement in Antibiotic Resistance in a Clinical Isolate[∇]

Astrid Pérez,¹ Delia Canle,² Cristina Latasa,³ Margarita Poza,¹ Alejandro Beceiro,¹ María del Mar Tomás,¹ Ana Fernández,¹ Susana Mallo,¹ Sonia Pérez,⁴ Francisca Molina,¹ Rosa Villanueva,¹ Iñigo Lasa,³ and Germán Bou^{1*}

Servicio Microbiología-Unidad de Investigación, Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo, La Coruña, Spain¹; Laboratorio de Microbiología, Hospital Comarcal de Valdeorras, Ourense, Spain²; Laboratory of Microbial Biofilms, Instituto de Agrobiotecnología, and Dpto. de Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra-CSIC. Pamplona, Spain³; and Laboratorio de Microbiología, Hospital Meixoeiro, Vigo, Spain⁴

Received 17 January 2007/Returned for modification 18 February 2007/Accepted 5 July 2007

Enterobacter cloacae is an emerging clinical pathogen that may be responsible for nosocomial infections. Management of these infections is often difficult, owing to the high frequency of strains that are resistant to disinfectants and antimicrobial agents in the clinical setting. Multidrug efflux pumps, especially those belonging to the resistance-nodulation-division family, play a major role as a mechanism of antimicrobial resistance in gram-negative pathogens. In the present study, we cloned and sequenced the genes encoding an AcrAB-TolC-like efflux pump from an *E. cloacae* clinical isolate (isolate EcDC64) showing a broad antibiotic resistance profile. Sequence analysis showed that the *acrR*, *acrA*, *acrB*, and *tolC* genes encode proteins that display 79.8%, 84%, 88%, and 82% amino acid identities with the respective homologues of *Enterobacter aerogenes* and are arranged in a similar pattern. Deletion of the *acrA* gene to yield an AcrA-deficient EcDC64 mutant (EcΔacrA) showed the involvement of AcrAB-TolC in multidrug resistance in *E. cloacae*. However, experiments with an efflux pump inhibitor suggested that additional efflux systems also play a role in antibiotic resistance. Investigation of several unrelated isolates of *E. cloacae* by PCR analysis revealed that the AcrAB system is apparently ubiquitous in this species.

Multidrug efflux pumps, especially those belonging to the resistance-nodulation-division family, play a major role in establishing the “intrinsic or acquired” resistance of gram-negative bacteria to a wide range of toxic compounds, including antibiotics (20).

A well-studied example is the AcrAB-TolC multidrug resistance (MDR) tripartite pump system of *Escherichia coli*, which confers resistance to a wide variety of lipophilic and amphiphilic compounds, including dyes, detergents, and antimicrobial agents such as ethidium bromide, crystal violet, sodium dodecyl sulfate, bile acids, tetracycline, chloramphenicol, fluoroquinolones, β -lactams, erythromycin, and fusidic acid (17, 18). The presence of similar systems has been reported for other members of *Enterobacteriaceae* (2, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 21, 28).

The species of *Enterobacter* that most commonly cause nosocomial infections are *E. cloacae* and *E. aerogenes* (24). The existence of an *acrB*-like gene (11) has previously been identified in *E. cloacae*, although none of the components of the efflux pump have been cloned.

The objectives of the present study were (i) to characterize the genes encoding the AcrAB-TolC-like efflux pump of *E. cloacae* and (ii) to determine the involvement of this efflux

pump in MDR in *E. cloacae*. The clinical strain used in the study was an MDR strain of *E. cloacae* (EcDC64) which overexpressed the AcrAB system and also overexpressed the chromosomal *ampC* gene and exhibited a drastic reduction of *ompC* gene expression.

(These results were presented in part at the 45th Inter-science Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy [2a].)

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth media. The bacterial strains used in the study are listed in Table 1. *Enterobacter cloacae* clinical isolate EcDC64 was isolated from a patient admitted to the intensive care unit of the Juan Canalejo Hospital (La Coruña, NW Spain). The bacterial isolate was identified by a MicroScan Walk-away (Dade Behring, Barcelona, Spain), and the identification was confirmed by API 20E (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). *Escherichia coli* TG1 strain was used for cloning procedures. All strains used in the study were maintained at -80°C in 15% (vol/vol) glycerol for cryoprotection until use. The strains were grown on MacConkey agar plates (Becton, Dickinson and Company, NJ), in Luria-Bertani (LB) broth, or on LB agar in the presence of 25 μg of kanamycin/ml or 20 μg of chloramphenicol/ml when required.

Susceptibility testing. Antibiotic susceptibility was determined by the following three different methods, depending on the antimicrobial availability.

The MICs of the following antibiotics were determined by Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden) following the manufacturer's criteria: ampicillin, penicillin, amoxicillin-clavulanic acid, piperacillin, cephalothin, cefoxitin, cefuroxime, ceftazidime, aztreonam, cefotaxime, imipenem, meropenem, oxacillin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, chloramphenicol, tobramycin, gentamicin, amikacin, ciprofloxacin, tigecycline, linezolid, and trimethoprim-sulfamethoxazole.

Susceptibility to the following antibiotics was determined by the standard disk diffusion method (Becton, Dickinson and Company, NJ) on Mueller-Hinton

* Corresponding author. Mailing address: Servicio de Microbiología-Unidad de Investigación, Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo, C/ Xubias de Arriba, s/n, 15006 La Coruña, Spain. Phone: 34 981-176087. Fax: 34 981-176097. E-mail: germanbou@canalejo.org.

[∇] Published ahead of print on 16 July 2007.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in the present study

| Strain or plasmid | Features (resistance marker ^a) | Source or reference |
|--------------------------------|---|---------------------|
| Strains | | |
| EcDC64 | Multiresistant <i>E. cloacae</i> clinical strain isolated from a patient admitted to our hospital | This study |
| EcΔacrA | EcDC64 with <i>acrA</i> gene knockout | This study |
| EcΔacrA(pAP-2) | EcΔacrA transformed with pAP-2 | This study |
| EcΔacrA(pACYC184) | EcΔacrA transformed with pACYC184 | This study |
| EcDC64(pAP-3) | EcDC64 transformed with pAP-3 | This study |
| EcDC64(pBGS18) | EcDC64 transformed with pBGS18 | This study |
| <i>E. cloacae</i> Jc 194 | Carbapenem-susceptible strain used as reference strain in RT-PCR experiments | This study |
| Plasmids | | |
| pBGS18 | Cloning vector (kanamycin) | 26 |
| pACYC184 | Cloning vector (chloramphenicol and tetracycline) | 3, 22 |
| pKOBEG | Cloning vector (chloramphenicol) | 4 |
| pAP-1 (pBGS18- <i>ampD</i>) | <i>ampD</i> gene from <i>E. coli</i> cloned into pBGS18 (kanamycin) | This study |
| pAP-2 (pACYC184- <i>acrA</i>) | <i>acrA</i> gene from EcDC64 isolate cloned into pACYC184 (chloramphenicol) | This study |
| pAP-3 (pBGS18- <i>acrR</i>) | <i>acrR</i> gene from <i>E. aerogenes</i> cloned into pBGS18 (kanamycin) | This study |

^a Resistance markers for plasmids are shown in parentheses.

agar: telithromycin, fusidic acid, novobiocin, nalidixic acid, rifampin, and norfloxacin.

The broth microdilution method (19) was used for detergents and dyes, sodium dodecyl sulfate, sodium cholate, sodium deoxycholate, acriflavine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), ethidium bromide, Triton X-100 (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany), and crystal violet (Merck, Darmstadt, Germany). The inoculum of *E. cloacae* cultures consisted of 5×10^5 CFU/ml, and the plates were incubated for 16 to 20 h at 37°C. As the end point, the lowest concentration of the compound that completely inhibited growth was recorded as the MIC.

The MICs of all antimicrobial agents, but not of the detergents and dyes (see Tables 4 and 5), were also determined with the efflux pump inhibitor Phe-Arg-β-naphthylamide (PAβN; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at a final concentration of 20 μg/ml.

AmpC overexpression. To demonstrate the involvement of AmpC expression in the β-lactam resistance of the EcDC64 isolate, β-lactam MICs were also determined in the presence of 100 μg/ml of cloxacillin. A plasmid construct named pAP-1 (Table 1), which consisted of the *ampD* gene from *E. coli* cloned into the pBGS18 plasmid, was also used. EcDC64 was electroporated with pAP-1, transformants were selected in 25 μg/ml of kanamycin, and the β-lactam MICs were determined and compared to those of EcDC64 carrying the empty vector.

PCR amplification and sequencing of *acrR*, *acrA*, *acrB*, and *tolC* efflux pump genes. Genomic DNA from EcDC64 was extracted from overnight cultures at 37°C by use of the MasterPure genomic DNA purification kit (EPICENTRE Biotechnologies, Madison, WI). The oligonucleotides used to clone efflux pump genes are listed in Table 2. Oligonucleotides were designed on the basis of the previously reported nucleotide sequence of the *E. aerogenes* AcrAB-TolC (21) (accession numbers AJ306389 and AJ306390) and the recently released *Enterobacter* sp. strain 638 complete genome (accession number CP000653). PCR was performed with the extracted genomic DNA in 50 μl of a mixture containing 50 ng of DNA template, 300 nM of each primer, 200 μM of each deoxynucleoside triphosphate, 1.5 mM MgCl₂, 5 μl of the polymerase buffer, and 2.6 U of Expand high-fidelity enzyme (Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Germany). After an initial denaturation step of 2 min at 94°C, amplification was performed over 25 cycles consisting of 15 s at 94°C, 30 s at the hybridization temperature (60°C, 55°C, 48°C, and 45°C for *acrA*, *acrB*, *tolC*, and *acrR* genes, respectively), and 1 min at 72°C for elongation, followed by a final extension step of 7 min at 72°C. The PCR product was purified by a HighPure PCR product purification kit (Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Germany) and then cloned into the pCR2.1-TOPO TA cloning vector according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Corporation, CA). Sequencing was carried out with a Taq DyeDeoxi-Terminator cycle sequencing kit in an automatic DNA sequencer (377 ABI-Prism; Perkin-Elmer). Each product was sequenced on both strands.

Disposition of each of the gene of the operon (*acrR*, *acrA*, and *acrB*) was achieved by individual PCR products overlapping each other through the use of the indicated oligonucleotides (Table 2) (data not shown).

Nucleotide and amino acid sequence analysis was carried out by use of the following programs: ExPASy Proteomics Tools (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html) and BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Construction of the *acrA* gene mutant. Disruption of the *acrA* gene in EcDC64 was performed by the method described by Datsenko and Wanner (6) with some modifications. The Red helper plasmid pKOBEG (gift from J. M. Ghigo) (4) (Table 1) is a low-copy-number plasmid that contains a gene for chloramphenicol resistance, a temperature-sensitive origin of replication, and the Red system, which includes three genes that express an exonuclease and the β and γ functions of phage λ. Plasmid pKOBEG (Table 1) was introduced into EcDC64 by heat shock, and transformants were selected on LB agar with chloramphenicol (20 μg/ml) after incubation for 24 h at 30°C. One transformant carrying the Red helper plasmid was made electrocompetent. A selectable kanamycin resistance gene was amplified by PCR from genomic DNA obtained from *E. coli* MC4100 (a gift from J. M. Ghigo) by use of primers that included 5' extensions with homology for the *acrA* locus, i.e., *acrAKm-F* (forward) and *acrAKm-R* (reverse) in Table 2. The PCR product was used to disrupt the *acrA* gene of EcDC64(pKOBEG) by electroporation. Electroporation (25 μF, 200 Ω, 2.5 kV) of the EcDC64 electrocompetent strain was carried out according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad Laboratories, Madrid, Spain) with 50 μl of cells and 1 μg of purified and dialyzed (0.025-μm nitrocellulose filters; Millipore, Billerica, MA) PCR product. Shocked cells were added to 1 ml of LB broth, incubated for 1 h at 30°C, spread onto LB agar with kanamycin (25 μg/ml), and then incubated at 30°C for 24 h. The EcΔ*acrA*::Km mutant strain was then grown on LB agar with kanamycin (25 μg/ml) at 43°C for 24 h and incubated overnight on LB agar with kanamycin (25 μg/ml) and LB agar with chloramphenicol (20 μg/ml) at 30°C to test for the loss of the helper plasmid.

To confirm the *acrA* deletion, a PCR assay with oligonucleotides (Table 2) that hybridize in the *acrA* gene was done. As expected, a band of 1,450 nucleotides (nt) was obtained by PCR, owing to the replacement of the *acrA* gene (1,194 nt) with the kanamycin resistance gene (1,450 nt).

Construction of pAP-2 and pAP-3 vectors. For pAP-2 construction (Table 1), two oligonucleotide primers (Table 2) were designed from the *acrA* sequence of *E. aerogenes* to amplify, by PCR, the *acrA* gene from EcDC64. The amplified DNA was purified, digested with EcoRV and HindIII, and then ligated (rapid DNA ligation kit; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) into a similarly digested expression pACYC184 vector under the control of the CTX-M-14 gene promoter. The CTX-M-14 gene promoter was first amplified with the pctx oligonucleotides (Table 2), designed from position 1502 to position 1740 of the sequence with EMBL database accession no. AF252622 from an *E. coli* clinical isolate harboring the *bla*_{CTX-M-14} gene, and then cloned into the pACYC184 vector. The accuracy of the construct was checked by restriction analysis. The recombinant plasmid (pAP-2) was then introduced into the EcΔ*acrA* competent cells for complementation studies.

For pAP-3 construction (Table 1), the full *acrR* gene was amplified with

TABLE 2. Oligonucleotides used in the present study

| Function | Primer | Gene | Procedure | Sequence (5'→3') ^b |
|--------------------------------|----------------------|--------------------------------------|--|---|
| Cloning | acrA-F | <i>acrA</i> | Cloning | <i>aagat</i> atcATGAACAAAAACAGAGGGTTAACG |
| | acrA-R | <i>acrA</i> | Cloning | <i>aaaagct</i> tTAAAGACTTGGTTTGTTCAGACTG |
| | acrB-F | <i>acrB</i> | Cloning | ATGCCTAATTCTTTATCGATCGC |
| | acrB-R ^a | <i>acrB</i> | Cloning | RTGRTGRTCNACNGGRTGRTT |
| | tolC-F | <i>tolC</i> | Cloning | ATGCAAATGAAGAAA |
| | tolC-R | <i>tolC</i> | Cloning | TTAATGACGGAACGGATT |
| | acrR-F | <i>acrR</i> from <i>E. aerogenes</i> | Cloning | <i>aaggatcc</i> ATGGGACGAAAAACCAAACAA CAGG |
| | acrR-R | <i>acrR</i> from <i>E. aerogenes</i> | Cloning | <i>aagaattc</i> TCAGGCCATGACCTCAGAGC |
| | pctx-F | promoter CTX-M-14 | Cloning | <i>aaaggatcc</i> CCATCAATAAAATTGAG |
| | pctx-R | promoter CTX-M-14 | Cloning | <i>aagat</i> atcCTCAAACTCCCAATACG |
| | acrAKm-F | <i>acrA</i> | Knockout | GGCGTCGTGACGCTCAAAATCCGAACCTCT CCAGATGACAACAGAAGTACCGGGCCG CACCAAAGCCACGTTGTGTCTCAA |
| | acrAKm-R | <i>acrA</i> | Knockout | TGAAGCTACTTCTGAGCCTTGACCTGCG CGCCAGGACGAACCTTTTTCGAAACCAAGT AATGCGCTGAGGTCTGCCTCGTG |
| Expression studies (RT-PCR) | rpoB-F ^a | <i>rpoB</i> | RT-PCR | CAGCCGCGAYCAGGTTGACTACA |
| | rpoB-R | <i>rpoB</i> | RT-PCR | GACGCACCGCAGGATACCACTG |
| | ompC-F | <i>ompC</i> | RT-PCR | AGGTTAACGATCAACTGACCGG |
| | ompC-R | <i>ompC</i> | RT-PCR | AAATTTTACAGCCGGCGAACGCC |
| | ompF-F | <i>ompF</i> | RT-PCR | AGTGGGAATATAACTTCCAGGG |
| | ompF-R | <i>ompF</i> | RT-PCR | TGCGTCACCGAATTTTACGGCC |
| | acrART-F | <i>acrA</i> | RT-PCR | GATTATGATTCTGCCTTGGCCG |
| | acrART-R | <i>acrA</i> | RT-PCR | CAATGCGACCGCTGATAGGGG |
| Operon assembly | aefA-F ^c | <i>aefA</i> from <i>E. cloacae</i> | Amplification of the <i>acrR-acrA</i> intergenic region | GTACATCGCGTTCTGCACGCG |
| | acrA2-R ^c | <i>acrA</i> from <i>E. cloacae</i> | Amplification of the <i>acrR-acrA</i> intergenic region | TGCCTTGACATCACCGCCTTC |
| | acrA3-F ^d | <i>acrA</i> from <i>E. cloacae</i> | Amplification of the <i>acrAB</i> intergenic region | CGACAAACAACAAGCGTCGGC |
| | acrB2-R ^d | <i>acrB</i> from <i>E. cloacae</i> | Amplification of the <i>acrAB</i> intergenic region | ATGATGATTATGGCGATCACCC |

^a Oligonucleotide degenerated where R is A or G; N is A, C, G, or T; and Y is C or T.^b Lowercase and italic nucleotides indicate restriction sites for cloning.^c Oligonucleotides used for amplification, cloning, and sequencing of the *acrR* gene and the *acrR-acrA* intergenic region of the operon from *E. cloacae* EcDC64. F, forward; R, reverse.^d Oligonucleotides used for amplification, cloning, and sequencing of the *acrAB* intergenic region of the operon from *E. cloacae* EcDC64. F, forward; R, reverse.

specific oligonucleotides *acrR-F* and *acrR-R* (Table 2). The amplified fragment of 650 bp was then digested with BamHI/EcoRI and ligated to the pBGS18 plasmid (26) under the control of the above-mentioned CTX-M-14 gene promoter. The accuracy of the construct was checked by restriction analysis. The recombinant plasmid (pAP-3) was then introduced into the EcDC64 competent cells for antimicrobial susceptibility studies.

Real-time RT-PCR. Real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) was carried out to determine the expression levels of the *ompC* and *ompF* porin genes as well as of the tripartite efflux component, *acrA*. In all cases, the expression levels were normalized to the *rpoB* housekeeping gene coding for the RNA polymerase beta subunit. Primers designed from sequences with accession numbers AJ316540, AJ316539, EF627524, and AJ854260 from the *ompF*, *ompC*, *acrA*, and *rpoB* genes, respectively, were used. Total RNA was isolated with TRIzol reagent (Invitrogen Corporation, CA) according to the manufacturer's instructions and treated with RNase-free DNase I (Invitrogen Corporation, CA). The concentration of RNA was determined spectrophotometrically. RNA (1 µg) was reverse transcribed into single-stranded cDNA by use of a Transcriptor first-strand cDNA synthesis kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. The cDNAs were quantified by real-time PCR amplification with specific primers (Table 2) by use of a Light Cycler 480 SYBR green I master kit and a Light Cycler 480 instrument (both from Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) with an initial incubation of 95°C for 10 min followed by 45 cycles of 10 s at 95°C, 20 s at 60°C, and 10 s at 72°C. The expression levels were standardized relative to the transcription levels of *rpoB* (a housekeeping gene) for each isolate.

Detection of the *acrA* gene in several *E. cloacae* isolates. To determine whether the AcrAB-TolC efflux pump is widespread among clinical isolates of *E. cloacae*,

a PCR assay was carried out to detect the *acrA* gene in different *E. cloacae* isolates. Six genotypically different *E. cloacae* isolates (repetitive extragenic palindromic-PCR tested), which showed different antibiotic susceptibility patterns and which had been collected in the hospital during the previous 5 years, were used. The reactions were carried out with a 50-µl volume of a reaction mixture containing 1.5 mM of MgCl₂, 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate, 300 nM of each primer, 50 ng of chromosomal DNA, 5 µl of the polymerase buffer, and 2.5 U of *Taq* polymerase. The primers of the *acrA*-coding region, *acrA-F* and *acrA-R* (Table 2), were used. Amplification reactions were submitted to the following program: initial denaturation (10 min at 94°C) followed by 30 cycles of denaturation (2 min at 94°C), annealing (1 min at 45°C), and extension (1 min at 72°C), with a single extension cycle of 10 min at 72°C.

Nucleotide sequence accession numbers. The nucleotide sequence data in the study will appear in the EMBL/GenBank/DBJ nucleotide sequence database. The accession numbers are as follows: EF627524 for the *acrR*, *acrA*, and *acrB* genes and AM287288 for the *tolC* gene.

RESULTS AND DISCUSSION

Cloning, sequencing, and analysis of the AcrAB-TolC efflux pump genes of *E. cloacae* EcDC64. *Enterobacter cloacae* EcDC64 was a clinical isolate which showed an antibiotic multiresistance profile (see Table 4).

The *acrR*, *acrA*, *acrB*, and *tolC* genes from EcDC64 were amplified by high-fidelity PCR, cloned into the pCR2.1-TOPO

A cloning vector, and sequenced. Sequence analysis showed that genes *acrR*, *acrA*, *acrB*, and *tolC* from *E. cloacae*, which were 654, 1,194, 3,147, and 1,485 bp long, encoded proteins of 18, 397, 1,048, and 494 amino acids, respectively. AcrR, AcrA, crB, and TolC proteins from EcDC64 displayed 79.8%, 84%, 83%, and 82% amino acid identities with the respective homologues of *E. aerogenes* (21) and showed similar levels of similarity with the homologues of other *Enterobacteriaceae*.

It should be noted that PCR experiments carried out with oligonucleotides designed on the *acrR* gene of *E. aerogenes* and hybridization studies with the full *acrR* gene of *E. aerogenes* as the probe failed to amplify the *acrR* gene. We therefore decided to amplify a region upstream of the putative location of the *acrR* gene on the genome map of *E. aerogenes*. For this purpose, we designed a forward oligonucleotide based on a consensus region of the *aefA* gene, which in turn was designed on the basis of that of *E. aerogenes* and the recently released genome of *Enterobacter* spp. (accession no. CP000653). Amplification experiments with the *aefA*-F and *acrA*-R primers (Table 2) yielded an amplicon of ca. 1,600 bp containing the entire *acrR* gene from *E. cloacae* and the partial coding region of *aefA*. The *acrR* gene of *E. cloacae* showed 73.9% nucleotide identity with that of *E. aerogenes* (21), notably lower than that observed for the *acrA* and *acrB* genes, which might account for the negative results obtained with the initial approach.

Assembling the sequence of the entire locus revealed an organization similar to that described for *E. aerogenes* (21), with the 22-bp *acrA*-*acrB* intergenic sequence (amplified with primers *acrA*3 and *acrB*2 [Table 2]) identical to that of *E. aerogenes*. The *acrR* and *acrA* genes are also transcribed divergently, and in the upstream *acrA* region, a 141-bp *acrR*-*acrA* intergenic sequence showed the same *acrA* and *acrR* promoter boxes previously found in *E. aerogenes* (GenBank accession no. J306389). Indeed, by RT-PCR, high levels of *acrR* and *acrA* expression were detected for EcDC64 compared to what was found for *E. cloacae* JC 194 (data not shown).

Construction of the EcΔacrA strain. To investigate the role of the AcrAB-TolC efflux pump in drug resistance, an *acrA* knockout of EcDC64 was constructed (EcΔacrA) by replacing part of the *acrA* gene with a kanamycin resistance cassette. The knockout of *acrA* was confirmed by PCR mapping as described in Materials and Methods (data not shown). RT-PCR results confirmed that no *acrA* expression was detectable in EcΔacrA (Table 3). When the EcΔacrA strain was transformed with pAP-2, RT-PCR analysis showed that the *acrA* expression was restored by complementation (Table 3).

Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in MDR. Susceptibility testing was carried out with EcDC64 (with and without PAβN), EcΔacrA (with and without PAβN), EcΔacrA(pAP-2), EcΔacrA(pACYC184), EcDC64(pAP-3), and EcDC64(pBGS18) (Tables 4, 5, and 6).

The efflux pump inhibitor PAβN affected the MICs of and susceptibilities to several antibiotics tested, revealing the presence of active drug efflux in EcDC64.

Analysis of the EcΔacrA mutant revealed an antibiotic susceptibility profile similar to that of EcDC64 in the presence of PAβN, with some exceptions (Tables 4 and 5). The data suggest that other efflux systems in addition to AcrAB-TolC operate in *E. cloacae* EcDC64. In this regard, the clearest result was that obtained with fusidic acid (Table 5). It appears that

TABLE 3. RT-PCR analysis of *ompC*, *ompF*, and *acrA* gene expression

| Gene | Strain | Relative expression ^a |
|-------------|--------------------------|----------------------------------|
| <i>ompF</i> | <i>E. cloacae</i> JC 194 | 1 |
| | EcDC64 | 0.2032 |
| | EcΔacrA | 0.1931 |
| <i>ompC</i> | <i>E. cloacae</i> JC 194 | 1 |
| | EcDC64 | 0.00235 |
| | EcΔacrA | 0.00252 |
| <i>acrA</i> | <i>E. cloacae</i> JC 194 | 1 |
| | EcDC64 | 490 |
| | EcΔacrA | 0.002 |
| | EcΔacrA(pAP-2) | >1,000 |
| | EcDC64(pAP-3) | 300 |

^a Relative expression is calculated as $2^{-\Delta CT}$, where $-\Delta CT$ is the ratio of the crossing point target value to the crossing point reference value. The target is the indicated bacterial isolate, whereas the reference is in all cases *E. cloacae* JC 194.

the AcrAB-TolC efflux system in *E. cloacae* does not pump out fusidic acid, unlike what is seen for other species of *Enterobacteriaceae* (19, 27).

Concerning the various antibiotics, β-lactam MICs were almost unaffected in EcΔacrA, with some exceptions (Table 4). The MICs of erythromycin and clindamycin were dramatically reduced in the knockout *acrA* mutant, as were those of tetracycline, chloramphenicol, and linezolid, while there were modest decreases in the MICs of aminoglycosides, ciprofloxacin, tigecycline, and trimethoprim-sulfamethoxazole. Susceptibility to telithromycin, novobiocin, nalidixic acid, norfloxacin, and rifampin was also increased in EcΔacrA. Antibiotic resistance was almost fully restored when the AcrA polypeptide was overexpressed in EcΔacrA (Tables 4 and 5).

On the other hand, the antimicrobial susceptibility of EcΔacrA further increased (in some cases dramatically) in the presence of PAβN, which points to the role of additional efflux systems.

Analysis of the antibiotic susceptibility pattern and MICs of EcDC64(pAP-3) revealed low MICs and large inhibition zones with most antimicrobial agents and other compounds studied compared to those for EcDC64 (Tables 4, 5, and 6). However, the effect was lower than that obtained with EcΔacrA, a fact which may be associated with the higher levels of expression of the *acrA* gene in EcDC64(pAP-3) than in EcΔacrA (Table 3). These results could be explained regarding the role of AcrR as a specific secondary modulator to fine-tune the level of *acrAB* transcription (13).

Analysis of detergents and dyes revealed lower MICs of most of them for the *acrA* knockout mutant than for its isogenic parental strain. The MICs of detergents and dyes indicated that the AcrAB-TolC efflux system is efficient at removing these products, with the exception of Triton X-100 (Table 6).

***acrA* detection in several *E. cloacae* isolates.** The *acrA* gene was detected by PCR in six genetically unrelated *E. cloacae* isolates used in the study (data not shown). This strongly suggests that the AcrAB-TolC efflux pump is resident in the species.

Other antibiotic resistance mechanisms in *E. cloacae* EcDC64. To analyze the involvement of efflux pumps in MDR in EcDC64, the intrinsic background of antibiotic resistance mechanisms that may act synergistically with efflux pumps must also be taken into account. EcDC64 showed a broad spectrum

TABLE 4. Antibiotic susceptibility profiles (MICs) for the indicated bacterial isolates

| Antibiotic ^a | MIC (μg/ml) for: | | | | | | | |
|-------------------------|------------------|----------------------------|---------|-----------------------------|----------------|-------------------|---------------|----------------|
| | EcDC64 | EcDC64 + PAβN ^b | EcΔacrA | EcΔacrA + PAβN ^b | EcΔacrA(pAP-2) | EcΔacrA(pACYC184) | EcDC64(pAP-3) | EcDC64(pBGS18) |
| AMP | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 |
| PEN | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 |
| AMC | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 |
| PIP | >256 | 192 | 192 | 6 | >256 | >256 | 96 | >256 |
| CEF | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 |
| FOX | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 |
| CXM | >256 | >256 | >256 | 48 | >256 | >256 | >256 | >256 |
| CAZ | >256 | >256 | >256 | 16 | >256 | >256 | >256 | >256 |
| CTX | >256 | >256 | >256 | 8 | >256 | >256 | >256 | >256 |
| IPM | >32 | 32 | 24 | 6 | >32 | >32 | 24 | >32 |
| MEM | >32 | 32 | 24 | 1 | >32 | >32 | 24 | >32 |
| ATM | >256 | 64 | 64 | 2 | >256 | 128 | 64 | >256 |
| OXA | >256 | 48 | 96 | 4 | >256 | >256 | >256 | >256 |
| ERY | >256 | 1 | 12 | 0.094 | 128 | 16 | 48 | >256 |
| CLI | >256 | 6 | 2 | 1 | >256 | 4 | 32 | >256 |
| TET | >256 | 64 | 64 | 1.5 | >256 | 64 | 192 | >256 |
| CHL | 8 | 0.25 | 0.5 | 0.047 | >256 | >256 | 1 | 8 |
| TOB | 1.5 | 0.5 | 0.125 | 0.047 | 1.5 | 0.25 | 0.38 | 1 |
| GEN | 1.5 | 0.5 | 0.125 | 0.094 | 1 | 0.125 | 0.25 | 1 |
| AMK | 2 | 1.5 | 0.5 | 0.125 | 2 | 0.5 | 1 | 2 |
| CIP | 0.047 | 0.006 | 0.003 | <0.002 | 0.094 | 0.004 | 0.003 | 0.032 |
| TGC | 0.75 | 0.125 | 0.125 | 0.064 | 0.75 | 0.5 | 0.19 | 0.38 |
| LZD | >256 | 4 | 8 | 0.5 | >256 | 4 | >256 | >256 |
| SXT | 0.125 | 0.094 | 0.012 | 0.032 | 0.75 | 0.016 | 0.064 | 0.094 |

^a Abbreviations for antibiotics: AMP, ampicillin; PEN, penicillin; AMC, amoxicillin-clavulanic acid; PIP, piperacillin; CEF, cephalothin; FOX, cefoxitin; CXM, cefuroxime; CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; ATM, aztreonam; IPM, imipenem; MEM, meropenem; OXA, oxacillin; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; TET, tetracycline; CHL, chloramphenicol; TOB, tobramycin; GEN, gentamicin; AMK, amikacin; CIP, ciprofloxacin; TGC, tigecycline; LZD, linezolid; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole.

^b MICs were determined with PAβN at 20 μg/ml.

of antibiotic resistance, with high-level resistance to β-lactams (including imipenem and meropenem). It has previously been reported that the interplay between AmpC expression and the reduction of porin expression may have an important role in β-lactam (including carbapenem) resistance in *E. cloacae* (10). We therefore aimed to determine if this was also true for the EcDC64 clinical isolate.

MICs for EcDC64 and for EcDC64 transformed with the *ampD* gene from *E. coli* were determined as well as for EcDC64 in the presence of cloxacillin. In both cases, there was a dramatic reduction in some β-lactam MICs (amoxicillin-clavulanic acid, most of the cephalosporins, and carbapenems), and indeed the MICs of imipenem and meropenem decreased from >32 to 2 and from >32 to 0.75 μg/ml, respectively. We

also aimed to determine whether or not a reduction of the expression of *ompC* and *ompF* genes occurred in EcDC64. Real-time RT-PCR enabled comparison of the levels of expression of *ompC* and *ompF* genes in the EcDC64 strain and in the carbapenem-susceptible *E. cloacae* JC 194. Overall, the results showed that the level of expression of *ompC* was extremely low and that the level of expression of *ompF* was also lower than that seen for strain JC 194 (Table 3). Altogether, the above results confirmed that AmpC overexpression and decreased porin expression were also present as resistance mechanisms in EcDC64.

Concluding remarks. The involvement of efflux mediated by the AcrAB-TolC system in the decreased susceptibility to several antibiotics of EcDC64 was demonstrated by different ap-

TABLE 5. Antibiotic susceptibility profiles, expressed as diameters of the inhibition zones (in mm) determined by the standard disk diffusion method, for the indicated bacterial isolates

| Antibiotic ^a | Susceptibility profile (diameter of inhibition zone [in mm]) for: | | | | | | | |
|-------------------------|---|----------------------------|---------|-----------------------------|----------------|-------------------|---------------|----------------|
| | EcDC64 | EcDC64 + PAβN ^b | EcΔacrA | EcΔacrA + PAβN ^b | EcΔacrA(pAP-2) | EcΔacrA(pACYC184) | EcDC64(pAP-3) | EcDC64(pBGS18) |
| TEL | 9 | 32 | 19 | 34 | 13 | 18 | 12 | 10 |
| FUS | 0 | >40 | 0 | 26 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| NOV | 0 | 20 | 16 | 22 | 0 | 14 | 0 | 0 |
| NAL | 24 | 27 | 33 | 40 | 12 | 30 | 29 | 21 |
| RIF | 0 | 26 | 13 | 28 | 0 | 8 | 10 | 10 |
| NOR | 26 | 40 | 40 | 42 | 24 | 38 | 35 | 27 |

^a Abbreviations for antibiotics: TEL, telithromycin; FUS, fusidic acid; NOV, novobiocin; NAL, nalidixic acid; RIF, rifampin; NOR, norfloxacin.

^b Concentration of PAβN, 20 μg/ml.

TABLE 6. MICs of detergents and dyes for bacterial isolates

| Compound | MIC (µg/ml) for: | | | | | |
|----------------------|------------------|---------|----------------|-------------------|---------------|----------------|
| | EcDC64 | EcΔacrA | EcΔacrA(pAP-2) | EcΔacrA(pACYC184) | EcDC64(pAP-3) | EcDC64(pBGS18) |
| dium dodecyl sulfate | 8,192 | 256 | 4,096 | 128 | 1,024 | 8,192 |
| dium deoxycholate | 8,192 | 256 | 4,096 | 256 | 512 | 8,192 |
| dium cholate | >16,384 | 2,048 | >16,384 | 2,048 | 4,096 | >16,384 |
| iton X-100 | >16,384 | >16,384 | >16,384 | >16,384 | >16,384 | >16,384 |
| riflavine | 128 | 16 | 64 | 16 | 32 | 128 |
| ystal violet | 4,096 | 512 | 1,024 | 256 | 1,024 | 4,096 |
| hidium bromide | 2,048 | 128 | 1,024 | 64 | 256 | 2,048 |

oaches. First, the MICs in the presence of the efflux pump inhibitor PAβN (20 µg/ml) significantly increased the susceptibility with respect to that of the wild-type strain. Second, knockout of the *acrA* gene increased susceptibility to many of the same compounds, although there were some differences which suggested the role of additional efflux systems. Third, transformation of EcDC64 with the *acrR* gene from *E. aerogenes* also reduced the MICs of most of the same antibiotics. The role of the efflux pump in β-lactam resistance has not been clearly elucidated because the host strain used in the present study bears a class C β-lactamase in its chromosome, overexpression of which affects most β-lactams. However, there was a decrease in piperacillin, aztreonam, oxacillin, and meropenem MICs when either the EcDC64 strain with PAβN or MICs in the EcΔacrA strain were analyzed.

The role of AcrAB-TolC-type efflux pumps in macrolide and tetracycline resistance has previously been described for some species of *Enterobacteriaceae* as a major mechanism of resistance (1, 9, 11, 15, 16, 19, 21). A macrolide-specific ABC-type exporter was recently reported for *E. coli* (8). This efflux system may also operate in the clinical isolate under study, which would explain the difference between the MIC of erythromycin for EcDC64 with PAβN and that for EcΔacrA (from 256 to 1 and 12 µg/ml, respectively).

It is noteworthy that this mechanism may at least partly explain the “intrinsic” resistance of *Enterobacter* to some antibiotics used to treat gram-positive infections, such as oxacillin, cefazolin, clindamycin, fusidic acid, novobiocin, and rifampin, although another efflux pump is probably involved in resistance to fusidic acid. In this regard, it has been demonstrated that the intracellular concentration of linezolid in strains of *E. coli*, *E. aerogenes*, and *Citrobacter freundii* is comparatively low due to an efficient efflux of the drug by the resistance-nodulation-division-type efflux pump (25).

Unlike the AcrAB-TolC efflux pump from *E. aerogenes* (5), which does not appear to pump out telithromycin, the clinical isolate EcDC64 increased the inhibition zone for this antibiotic (from 9 to 19 mm) when the *acrA* gene was deleted. As with *E. aerogenes*, a more dramatic effect was observed when MICs of EcDC64 were determined in the presence of an efflux pump inhibitor (PAβN) (Table 5).

As for the clinical isolate under study, the AcrAB efflux pumps in *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae* have been associated with decreased susceptibility to tigecycline (23), although in the present case the increase in susceptibility of the *acrA* knockout isolate was lower (the knockout strain MIC was sixfold lower than that for the parental strain). It is

interesting that Keeney et al. (7) have recently reported the involvement of AcrAB of *E. cloacae* in decreased susceptibility to tigecycline, although the values reported (16- to 32-fold reductions) are higher than those we have described here. These differences may be related to the level of AcrAB-TolC gene expression in the strains under study.

ACKNOWLEDGMENTS

Margarita Poza is a receipt of an Isidro Parga Pondal research contract, Alejandro Beceiro of a scholarship from SEIMC, and María del Mar Tomás of a postMIR research contract from the Instituto de Salud Carlos III. The study was partly financed by the Consellería de Innovación, Industria y Comercio, Xunta de Galicia (PGIDIT04BTF916028PR), Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI040514 and PI061368), and also supported by Ministerio de Sanidad y Consumo, ISCIII, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008).

We thank I. Rego for technical assistance in RT-PCR experiments.

REFERENCES

- Baucheron, S., S. Tyler, D. Boyd, M. R. Mulvey, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert. 2004. AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:3729–3735.
- Berlanga, M., J. L. Vazquez, J. Hernandez-Borrell, M. T. Montero, and M. Vinas. 2000. Evidence of an efflux pump in *Serratia marcescens*. *Microb. Drug Resist.* **6**:111–117.
- Canle, D., M. Cartelle, C. Latasa, I. Lasa, R. Villanueva, and G. Bou. 2005. Abstr. 45th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. C1-1035.
- Chang, A. C. Y., and S. N. Cohen. 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**:1141–1156.
- Chaveroche, M. K., J. M. Ghigo, and C. d'Enfert. 2000. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* **28**:e97.
- Chollet, R., J. Chevalier, A. Bryskier, and J. M. Pages. 2004. The AcrAB-TolC is involved in macrolide resistance but not in telithromycin efflux in *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:3621–3624.
- Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:6640–6645.
- Keeney, D., A. Ruzin, and P. A. Bradford. 2007. RamA, a transcriptional regulator, and AcrAB, an RND-type efflux pump, are associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Enterobacter cloacae*. *Microb. Drug Resist.* **13**:1–6.
- Kobayashi, N., K. Nishino, and A. Yamaguchi. 2001. Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:5639–5644.
- Kumar, A., and E. A. Worobec. 2002. Fluoroquinolone resistance of *Serratia marcescens*: involvement of a proton gradient-dependent efflux pump. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**:593–596.
- Lee, E. H., E. Collatz, J. Trias, and L. Gutmann. 1992. Diffusion of beta-lactam antibiotics into proteoliposomes reconstituted with outer membranes of isogenic imipenem-susceptible and -resistant strains of *Enterobacter cloacae*. *J. Gen. Microbiol.* **138**:2347–2351.
- Linde, H. J., F. Notka, C. Irtenkauf, J. Decker, J. Wild, H. H. Niller, P. Heisig, and N. Lehn. 2002. Increase in MICs of ciprofloxacin in vivo in two closely related clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**:625–630.

12. Linde, H. J., F. Notka, M. Metz, B. Kochanowski, P. Heisig, and N. Lehn. 2000. In vivo increase in resistance to ciprofloxacin in *Escherichia coli* associated with deletion of the C-terminal part of MarR. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1865–1868.
13. Ma, D., M. Alberti, C. Lynch, H. Nikaido, and J. E. Hearst. 1996. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of acrAB genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol. Microbiol.* **19**:101–112.
14. Mallea, M., J. Chevalier, C. Bornet, A. Eyraud, A. Davin-Regli, C. Bollet, and J. M. Pages. 1998. Porin alteration and active efflux: two in vivo drug resistance strategies used by *Enterobacter aerogenes*. *Microbiology* **144**:3003–3009.
15. Mazzariol, A., J. Zuliani, G. Cornaglia, G. M. Rossolini, and R. Fontana. 2002. AcrAB efflux system: expression and contribution to fluoroquinolone resistance in *Klebsiella* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3984–3986.
16. Mazzariol, A., Y. Tokue, T. M. Kanegawa, G. Cornaglia, and H. Nikaido. 2000. High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3441–3443.
17. Nikaido, H. 1998. Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin. Infect. Dis.* **27**:32–41.
18. Nikaido, H., and H. I. Zgurskaya. 1999. Antibiotic efflux mechanisms. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **12**:529–536.
19. Nikaido, H., M. Basina, V. Nguyen, and E. Y. Rosenberg. 1998. Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those β -lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *J. Bacteriol.* **180**:4686–4692.
20. Poole, K. 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**:12–26.
21. Pradel, E., and J. M. Pages. 2002. The AcrAB-TolC efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2640–2643.
22. Rose, R. E. 1988. The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Res.* **16**:355.
23. Ruzin, A., M. A. Visalli, D. Keeney, and P. A. Bradford. 2005. Influence of transcriptional activator RamA on expression of multidrug efflux pump AcrAB and tigecycline susceptibility in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1017–1022.
24. Sanders, W. E., and C. C. Sanders. 1997. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:220–241.
25. Schumacher, A., R. Trittl, J. A. Bohnert, K. Kummerer, J. M. Pages, and W. V. Kern. 2007. Intracellular accumulation of linezolid in *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Enterobacter aerogenes*: role of enhanced efflux pump activity and inactivation. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**:1261–1264.
26. Spratt, B., P. J. Hedge, T. S. Heesen, A. Edelman, and J. K. Broome-Smith. 1986. Kanamycin-resistant vectors that are analogues of plasmids pUC8, pUC9, pEMBL8, and pEMBL9. *Gene* **41**:337–342.
27. Sulavik, M. C., C. Houseweart, C. Cramer, N. Jiwani, N. Murgolo, J. Greene, B. DiDomenico, K. J. Shaw, G. H. Miller, R. Hare, and G. Shimer. 2001. Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1126–1136.
28. Visalli, M. A., E. Murphy, S. J. Projan, and P. A. Bradford. 2003. AcrAB multidrug efflux pump is associated with reduced levels of susceptibility to tigecycline (GAR-936) in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:665–669.

7.2. Artículo capítulo II.

Involvement of the AcrAB-TolC Efflux Pump in the Resistance, Fitness, and Virulence of *Enterobacter cloacae*

Astrid Pérez, Margarita Poza, Ana Fernández, María del Carmen Fernández, Susana Mallo, María Merino, Soraya Rumbo-Feal, María P. Cabral, and Germán Bou

Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, A Coruña, Spain

Multidrug efflux pumps have emerged as important mechanisms of antimicrobial resistance in bacterial pathogens. In order to cause infection, pathogenic bacteria require mechanisms to avoid the effects of host-produced compounds, and express efflux pumps may accomplish this task. In this study, we evaluated the effect of the inactivation of AcrAB-TolC on antimicrobial resistance, fitness, and virulence in *Enterobacter cloacae*, an opportunistic pathogen usually involved in nosocomial infections. Two different clinical isolates of *E. cloacae* were used, EcDC64 (multidrug resistance overexpressing the AcrAB-TolC efflux pump) and Jc194 (basal AcrAB-TolC expression). The *acrA* and *tolC* genes were deleted in strains EcDC64 and Jc194 to produce, respectively, Ec Δ *acrA* and Ec Δ *tolC* and Jc Δ *acrA* and Jc Δ *tolC* knockout (KO) derivatives. Antibiotic susceptibility testing was performed with all isolates, and we discovered that these mechanisms are involved in the resistance of *E. cloacae* to several antibiotics. Competition experiments were also performed with wild-type and isogenic KO strains. The competition index (CI), defined as the mutant/wild-type ratio, revealed that the *acrA* and *tolC* genes both affect the fitness of *E. cloacae*, as fitness was clearly reduced in the *acrA* and *tolC* KO strains. The median CI values obtained *in vitro* and *in vivo* were, respectively, 0.42 and 0.3 for EcDC64/Ec Δ *acrA*, 0.24 and 0.38 for EcDC64/Ec Δ *tolC*, 0.15 and 0.11 for Jc194/Jc Δ *acrA*, and 0.38 and 0.39 for Jc194/Jc Δ *tolC*. Use of an intraperitoneal mouse model of systemic infection revealed reduced virulence in both *E. cloacae* clinical strains when either the *acrA* or *tolC* gene was inactivated. In conclusion, the structural components of the AcrAB-TolC efflux pump appear to play a role in antibiotic resistance as well as environmental adaptation and host virulence in clinical isolates of *E. cloacae*.

The AcrAB-TolC system is a tripartite complex that is widely distributed in Gram-negative bacteria. The three components of the system are AcrB, the inner membrane transporter protein, AcrA, the periplasmic adaptor protein, and TolC, the outer membrane channel. AcrA protein is believed to be involved *in vivo* in the assembly and maintenance of a stable complex that transmits conformational changes in AcrB and TolC (20, 35), thus leading to opening of the outer membrane channel (23). Although the components of the AcrAB-TolC pump work together as a tripartite system, the individual components may also play certain roles in other efflux systems (30). For example, in *Escherichia coli*, TolC has been shown to be required for the functioning of many efflux systems, including the resistance-nodulation-division (RND) pumps AcrD (15), (26), AcrEF (26), MdsAB (25), and MdtABC (24), as well as the major facilitator superfamily (MFS) systems EmrAB and EmrKY (27, 26), and also the ABC drug transporter MacAB (18). Similarly, AcrA has been shown to associate with AcrD (10, 11) and AcrF (10, 17) as well as with AcrB and TolC.

Multidrug efflux pumps, such as the RND superfamily member AcrAB-TolC, have been shown to be clinically relevant mechanisms of resistance to multiple antibiotics used to treat human infections. These pumps confer innate resistance to a wide range of toxic compounds such as antibiotics, dyes, detergents, and disinfectants in members of the *Enterobacteriaceae* (30, 31) and may be associated with multidrug resistance (MDR). Some studies suggest that overexpression of AcrAB is a marker of multidrug resistance (34). In regard to *Enterobacter cloacae*, our research group previously described the importance of this AcrAB-TolC efflux pump in conferring resistance to different antimicrobial agents, as well as to dyes and biocides (29).

In addition to an established role in antimicrobial resistance, some MDR efflux pumps not only confer resistance to drugs used

in therapy but have also been shown to have a role in bacterial pathogenicity, in the colonization of a variety of host organisms, and in their survival therein (21, 30). The efflux pumps are responsible for expelling host-derived antimicrobial agents, such as bile salts, long-chain fatty acids, and antimicrobial peptides (21, 30). Thus, several studies have demonstrated (21) that inactivation of the efflux pump AcrAB-TolC by the lack of one of its structural components directly affects the virulence of the bacteria, indicating that this system is required for the bacteria to be pathogenic.

Although *E. cloacae* and *Enterobacter aerogenes* are the most common *Enterobacter* species that cause nosocomial infections, little is known about their pathogenic potential. These organisms cause a wide variety of infections, sepsis, infections of the respiratory tract and urinary tract, wound infections, and meningitis (although the latter is rare). They are frequently found in the gastrointestinal tract, which is usually the source of infection. Multiple-antibiotic-resistant strains have caused outbreaks in hospitals, usually involving settings where seriously ill patients are housed, such as intensive care units. Greater resistance to disinfectants and antimicrobial agents than in other members of the *Enterobacteriaceae* probably plays a role in the increasing prevalence of these organisms as nosocomial pathogens. However, the role that the

Received 10 August 2011 Returned for modification 12 November 2011

Accepted 15 January 2012

Published ahead of print 30 January 2012

Address correspondence to Germán Bou, German.Bou.Arevalo@sergas.es.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.05509-11

TABLE 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

| Strain or plasmid | Feature ^a | Source or reference |
|--------------------------------|--|---------------------|
| Strains | | |
| <i>E. cloacae</i> EcDC64 | MDR phenotype strain overexpressing AcrAB-TolC efflux pump | 29 |
| EcΔ <i>acrA</i> ::Km | EcDC64 with <i>acrA</i> gene interrupted with a kanamycin resistance marker | 29 |
| EcΔ <i>acrA</i> (pAPG-1) | EcΔ <i>acrA</i> transformed with pAPG-1 | 29 |
| EcΔ <i>acrA</i> (pACYC184) | EcΔ <i>acrA</i> transformed with pACYC184 | 29 |
| EcΔ <i>tolC</i> ::Km | EcDC64 with <i>tolC</i> gene interrupted with a kanamycin resistance marker | This study |
| EcΔ <i>tolC</i> (pAPG-2) | EcΔ <i>tolC</i> transformed with pAPG-2 | This study |
| EcΔ <i>tolC</i> (pUCP24) | EcΔ <i>tolC</i> transformed with pUCP24 | This study |
| <i>E. cloacae</i> Jc194 | Clinical isolate with a basal efflux pump expression and a more sensitive profile of resistance than that of strain EcDC64 | 29 |
| JcΔ <i>acrA</i> ::Tc | Jc194 with <i>acrA</i> gene interrupted with a tetracycline resistance marker | This study |
| JcΔ <i>acrA</i> (pAPG-1) | JcΔ <i>acrA</i> transformed with pAPG-1 | This study |
| JcΔ <i>acrA</i> (pACYC184) | JcΔ <i>acrA</i> transformed with pACYC184 | This study |
| JcΔ <i>tolC</i> ::km | Jc194 with <i>tolC</i> gene interrupted with a kanamycin resistance marker | This study |
| JcΔ <i>tolC</i> (pAPG-2) | JcΔ <i>tolC</i> transformed with pAPG-2 | This study |
| JcΔ <i>tolC</i> (pUCP24) | JcΔ <i>tolC</i> transformed with pUCP24 | This study |
| Plasmids | | |
| pACYC184 | Cloning vector (chloramphenicol and tetracycline) | 7, 32 |
| pUCP24 | Cloning vector (gentamicin) | 37 |
| pKOBEG | Red helper plasmid (chloramphenicol) | 8 |
| pAPG-1(pACYC184- <i>acrA</i>) | <i>acrA</i> gene from EcDC64 cloned into pACYC184 | 29 |
| pAPG-2(pUCP24- <i>tolC</i>) | <i>tolC</i> gene from EcDC64 cloned into pUCP24 | This study |

^a Resistance markers for plasmids are shown in parentheses.

AcrAB efflux pump plays in the pathogenesis of infections caused by *E. cloacae* has not been investigated (33).

In this study, both the AcrA and the TolC components of the AcrAB-TolC efflux pump were deleted in two clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in order to investigate the effect of the lack of both structural components on the resistance, fitness, and virulence of this microorganism in an experimental mouse model of infection.

MATERIALS AND METHODS

Strains, culture media, and plasmids. Laboratory strains and plasmids used in the study are listed in Table 1. The clinical isolates used were two strains of *Enterobacter cloacae*, EcDC64 and Jc194. Both strains were isolated from a patient admitted to the Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (A Coruña, Spain). The EcDC64 strain showed an MDR phenotype overexpressing the AcrAB-TolC efflux pump, while the Jc194 strain showed basal efflux pump expression and a more sensitive antibiotic resistance profile than strain EcDC64 (29). *Escherichia coli* strain TG1 was used for cloning procedures. All strains used in the study were maintained at -80°C in 15% (vol/vol) glycerol (for cryoprotection) until use. The strains were grown on MacConkey agar plates (Becton, Dickinson and Company, NJ), in Luria-Bertani (LB) broth, or on LB agar in the presence of 50 μg of ampicillin/ml, 25 μg of kanamycin/ml, 30 μg of chloramphenicol/ml, 4 μg of gentamicin/ml, or 30 μg of tetracycline/ml (all from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) when required.

Construction of knockout strains. Disruption of the *acrA* and *tolC* genes in strains EcDC64 and Jc194 was performed by the method described by Datsenko and Wanner (9), with some modifications. The Red helper pKOBEG (kindly donated by J. M. Ghigo, Institut Pasteur, France) (Table 1) is a low-copy-number plasmid that contains a gene for chloramphenicol resistance, a temperature-sensitive origin of replication, and the Red system, which comprises an exonuclease and the β and γ functions of phage λ . The pKOBEG plasmid (Table 1) was introduced into strains EcDC64 and Jc194 by heat shock, and transformants were selected on LB agar with chloramphenicol, after incubation for 24 h at 30°C . One transformant carrying the Red helper plasmid was made electrocompe-

tent. A selectable resistance gene was amplified by PCR from genomic DNA by use of primers, including 5' extensions with homology for the *acrA* or *tolC* loci listed in Table 2. The PCR product was used to disrupt the *acrA* and *tolC* genes of strains EcDC64 and Jc194 by electroporation. Electroporation (25 μF , 200 Ω , and 2.5 kV) of the electrocompetent strains was carried out according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad Laboratories, Madrid, Spain), with 50 μl of cells and 1 μg of the purified and dialyzed PCR products (0.025- μm nitrocellulose membranes; Millipore, Billerica, MA). Shocked cells were added to 1 ml of LB broth, incubated overnight at 30°C , spread on LB agar containing kanamycin and tetracycline, and incubated at 30°C for 24 h. The mutant strains were then grown on LB agar containing kanamycin and tetracycline at 44°C for 24 h and incubated overnight on LB agar containing kanamycin, tetracycline, and chloramphenicol, at 30°C , to test for loss of the helper plasmid.

Cloning procedures. Recombinant plasmids were first constructed and then introduced into the *acrA* and *tolC* knockout strains for complementation studies. For construction of pAPG-1 (Table 1), specific primers were designed to amplify the *acrA* gene from *E. cloacae* strain EcDC64. The amplified DNA was purified, digested with EcoRV and HindIII, and then ligated with the T4 DNA ligase (Promega Corporation, Madison, WI) into a similarly digested pACYC184 expression vector under the control of the CTX-M-14 gene promoter (29). The accuracy of the construct was checked by restriction analysis.

For construction of pAPG-2 (Table 1), the *tolC* gene was amplified from strain EcDC64 with specific oligonucleotides (Table 2). The amplified fragment of 1,485 bp was purified and digested with BamHI/HindIII and ligated into the pUCP24 expression vector (Table 1), previously digested with the same enzymes, under the control of the *lacZ* promoter.

Antimicrobial susceptibility testing. MICs of the following antibiotics were determined by Etest (bioMérieux, Durham, NC), following the manufacturer's instructions: oxacillin, erythromycin, clindamycin, linezolid, ciprofloxacin, chloramphenicol, tetracycline, and tigecycline.

In vitro competition experiments. *In vitro* competition experiments were performed with each of the isogenic pairs EcDC64/EcΔ*acrA*, EcDC64/EcΔ*tolC*, Jc194/JcΔ*acrA* and Jc194/JcΔ*tolC*. Exponentially growing cells of the corresponding mutant and wild-type strains in LB broth

TABLE 2 Oligonucleotides used in this study

| Primer | Gene | Procedure | Sequence (5'→3') ^a |
|-----------------------|-------------|-----------|--|
| acrA-F | <i>acrA</i> | Cloning | <i>aagat</i> atcATGAACAAAAACAGAGGGTTAACG |
| acrA-R | <i>acrA</i> | Cloning | <i>aaaag</i> cttTTAAGACTTGGTTTGTTCAGACTG |
| tolC-F | <i>tolC</i> | Cloning | <i>ggat</i> ccATGCAAAATGAAGAAATGCTCC |
| tolC-R | <i>tolC</i> | Cloning | <i>aag</i> cttTTAATGACGGAACGGATTTCGTG |
| acrAKmR ^b | <i>acrA</i> | Knockout | TGAAGCTACTTCCTGAGCCTTGACCTGCGCGCCAGGACGAACTTTTTCGAAACCAGTAATGCGCTGAGGTCTGCCTCGTG |
| acrAKmF ^b | <i>acrA</i> | Knockout | GGCGTCGTGACGCTCAAATCCGAACCTCTCCAGATGACAACAGAACTACCGGGCCGACCAAAGCCACGTTGTGTCTCAA |
| acrATcF ^c | <i>acrA</i> | Knockout | GGCGTCGTGACGCTCAAATCCGAACCTCTCCAGATGACAACAGAACTACCGGGCCGACCCACGCTGTTAATCACTTTACTT |
| acrATcR ^c | <i>acrA</i> | Knockout | TGAAGCTACTTCCTGAGCCTTGACCTGCGCGCCAGGACGAACTTTTTCGAAACCAGTAGGTAGCGACCGGCGCTCAGT |
| tolCKmF ^d | <i>tolC</i> | Knockout | ACACTAACGGTTTTTCGCGATAACAATGGCATCGATTGCAATGCCACCAGCGCCTCTTTACAGCTTACACAAACCCTGTTCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG |
| tolCKmR ^d | <i>tolC</i> | Knockout | TCGTCATAGGCCTGAGACGTCGTTTTAGACCCGCTGTAGCTGGTATCCGATACGCCGGTCGAGGCGCTCAGGCTCAGCGTCATATGAATATCCTCCTTAG |
| tolC2KmF ^e | <i>tolC</i> | Knockout | ATGCTCTGCTGAAAGAAGCGGAAAACCGCAACCTGACCTTATTGCAGGCGCGCTGAGCCAGGACCTGGCACGCGAGCAGATCCGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG |
| tolC2KmR ^e | <i>tolC</i> | Knockout | CAACCGGGGCGCTGCTGTAGCGGTGAAATTATCCACGGCGGCATCCTGCTGTGGATTTCCGGCGCGACGCTGTCAGGCCATATGAATATCCTCCTTAG |

^a Nucleotides indicated in lowercase italics are restriction sites for cloning.

^b Oligonucleotides used to disrupt the *acrA* gene from *E. cloacae* strain EcDC64.

^c Oligonucleotides used to disrupt the *acrA* gene from *E. cloacae* strain Jc194.

^d Oligonucleotides used to disrupt the *tolC* gene from *E. cloacae* strain EcDC64.

^e Oligonucleotides used to disrupt the *tolC* gene from *E. cloacae* strain Jc194.

were mixed in a 1:1 ratio and diluted in 0.9% saline solution. Approximately 10^3 cells from each of the mixtures were inoculated into eight flasks containing 10 ml of LB broth and grown at 37°C and 180 rpm for 16 to 18 h, corresponding to approximately 20 generations. Serial 10-fold dilutions were plated in duplicate on LB agar alone and on LB agar containing 50 µg/ml of kanamycin or 30 µg/ml of tetracycline (depending on the knockout mutant strain), in order to determine the total CFU and the CFU of the mutant, respectively, after overnight incubation at 37°C. The competition index (CI) was defined as the mutant/wild-type ratio. The CI values were calculated for each of the eight independent competition experiments, and the median values were recorded. To assess the growth rates under noncompetitive conditions, growth curves were constructed for all strains. The cells were cultured for 24 h in LB broth at 37°C and 180 rpm. The OD₆₀₀ was measured at 30-min intervals during the exponential phase and thereafter every hour. Three independent experiments were performed for each of the mutants. The growth rate (μ) was calculated on the basis of the exponential segment of the growth curve, and defined as $\ln 2g^{-1}$, where g is the time taken for an exponentially growing culture to double in size (1).

In vivo competition experiments and virulence assays. *In vivo* fitness was assessed by competition experiments in the mouse model of systemic infection. For this purpose, 1:1 mixtures of each of the mutant–wild-type pairs containing a total of approximately 2×10^6 exponentially growing cells were injected intraperitoneally into eight 18- to 25-g C57 mice (General Animal Experimentation and Production Service, University of Seville, Spain). Mice were sacrificed 24 h after injection, and their spleens were aseptically extracted and homogenized in 1 ml of 0.9% saline solution (in a Retsch MM200 mixer mill) to enable the number of CFU of each strain to be determined. The CI values were determined as described for *in vitro* competition experiments.

To assess the effect on virulence, approximately 3×10^7 exponentially growing cells of EcDC64, Jc194, Ec Δ *acrA*, Ec Δ *tolC*, Jc Δ *acrA*, and Jc Δ *tolC* were injected intraperitoneally into groups of six immunosuppressed C57 mice, weighing 18 to 22 g (General Animal Experimentation and Production Service, University of Seville, Spain), previously treated with cyclophosphamide (100 mg/kg) for 3 days. The mice were processed as described above to determine the number of CFU of each strain.

RESULTS

Role of AcrAB-TolC efflux pump in antibiotic resistance in *E. cloacae*. The susceptibilities to a number of antibiotics, of both wild-type *E. cloacae* strains described above and their derived isogenic efflux pump knockouts, Ec Δ *acrA*, Ec Δ *tolC*, Jc Δ *acrA*, and Jc Δ *tolC*, were determined (Table 3). The MICs of most of the antibiotics tested in wild-type strains were high. This is because the antibiotics tested are good substrates of the efflux pumps belonging to the RND family, such as AcrAB-TolC, which are expressed by Gram-negative bacteria and provide intrinsic resistance to some of the antibiotics studied. However, for *E. cloacae* strain Jc194, the MICs of the antibiotics tested were lower, which is consistent with lower expression of AcrAB-TolC (29). The MICs of all antibiotics were lower for the *acrA* knockout strains than for the wild-type isolates (Table 3). In regard to the various antibiotics, the MICs of erythromycin, clindamycin, and linezolid were greatly reduced in both strains, as were those of ciprofloxacin, chloramphenicol, and tigecycline for Ec Δ *acrA*, while there were modest decreases in the MICs of these antibiotics in the case of Jc Δ *acrA*. However, the loss of the *acrA* gene had a greater effect on the MIC of oxacillin in strain Jc194. Although both wild-type strains are resistant to erythromycin, clindamycin, linezolid, and oxacillin, these antibiotics were selected for susceptibility testing since they are good substrates of AcrAB-TolC, which allowed us to clarify the role of the distinct components of the efflux pump in both strains. Antibiotic resistance was fully restored when the AcrA protein was overexpressed in *acrA* knockout strains (Table 3). The role of AcrA in the Jc Δ *acrA* tetracycline MIC was not studied because this strain has a tetracycline marker in its genome.

Analysis of Ec Δ *tolC* and Jc Δ *tolC* derivative isolates revealed a similar antibiotic susceptibility profile to that of their parental strains. Oxacillin and tetracycline MICs were unaffected, as were the MICs of tigecycline and ciprofloxacin, which remained almost

TABLE 3 Antibiotic susceptibility profiles (MICs) for the bacterial strains indicated

| MIC ($\mu\text{g/ml}$) for: | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|--------|------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>E. cloacae</i> EcDC64 | | | | | | | | <i>E. cloacae</i> Jc194 | | | | | | |
| Antibiotic ^a | EcDC64 | Ec Δ acrA | Ec Δ acrA (pAPG-1) | Ec Δ acrA (pACYC184) | Ec Δ tolC | Ec Δ tolC (pAPG-2) | Ec Δ tolC (pUCP24) | Jc194 | Jc Δ acrA | Jc Δ acrA (pAPG-1) | Jc Δ acrA (pACYC184) | Jc Δ tolC | Jc Δ tolC (pAPG-2) | Jc Δ tolC (pUCP24) |
| OXA | >256 | 128 | >256 | 256 | >256 | >256 | >256 | >256 | 32 | >256 | 24 | >256 | 96 | 32 |
| ERY | >256 | 12 | 128 | 16 | 96 | >256 | 96 | 96 | 4 | >256 | 6 | 16 | 24 | 6 |
| CLI | >256 | 2 | >256 | 4 | 24 | 48 | 12 | >256 | 1.5 | >256 | 3 | 8 | 12 | 2 |
| LZD | >256 | 8 | >256 | 4 | 12 | 32 | 12 | >256 | 4 | >256 | 4 | 6 | 8 | 2 |
| CIP | 0.094 | 0.008 | 0.094 | 0.004 | 0.064 | 0.125 | 0.047 | 0.023 | 0.012 | 0.032 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.008 |
| CHL | 8 | 0.5 | >256 | >256 | 2 | 6 | 1 | 4 | 0.75 | >256 | >256 | 1.5 | 3 | 0.5 |
| TET | >256 | 64 | >256 | 64 | >256 | >256 | 256 | 2 | >256 | >256 | >256 | 1.5 | 2 | 1 |
| TGC | 1.5 | 0.19 | 1 | 0.5 | 1 | 2 | 1 | 0.75 | 0.25 | 0.75 | 0.38 | 0.5 | 0.5 | 0.38 |

^a OXA, oxacillin; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; LZD, linezolid; CIP, ciprofloxacin; CHL, chloramphenicol; TET, tetracycline; TGC, tigecycline.

unchanged. There were slight decreases in the MICs of chloramphenicol and erythromycin, while susceptibility to clindamycin and linezolid was significantly increased and was higher in strain Jc194. The antibiotic susceptibility was lower in *tolC* mutants when the TolC protein was overexpressed, although the MIC of some antibiotics was not fully restored. Overall, deletion of *acrA* as well as *tolC* was associated with antimicrobial resistance in *E. cloacae*.

Role of the AcrAB-TolC efflux pump in the fitness of *E. cloacae*. To investigate the involvement of the AcrAB-TolC efflux pump on the fitness of *E. cloacae*, *acrA* and *tolC* knockouts were constructed in strains EcDC64 and Jc194 by replacing part of the genes with a resistance cassette, as described in Materials and Methods. To clarify whether the inactivation of the efflux pump affects the growth rate, growth curves were constructed for all strains studied. None of the EcDC64 knockout strains showed significant modification of the growth rate (0.263 h^{-1} for EcDC64, 0.260 h^{-1} for Ec Δ acrA, and 0.265 h^{-1} for Ec Δ tolC) relative to the wild-type strain. Moreover, Jc Δ acrA showed a clearly lower growth rate (0.199 h^{-1}) in the first phase of growth (during the first 2 h) than the wild-type strain (0.256 h^{-1}) and Jc Δ tolC (0.259 h^{-1}). From 2 h onwards, growth of strain Jc194 equates to the wild-type and Jc Δ tolC strains (Fig. 1). After 12 h of growth in culture, the optical density of Jc194 and those of its KO derivatives were almost the same.

In vitro and *in vivo* competition experiments were performed

for each knockout strain versus the wild-type strain, as described in Materials and Methods. The CI values obtained for each of the *in vitro* competition experiments are shown in Fig. 2. In all cases, the lack of a structural component of the efflux pump AcrAB-TolC had a fitness cost for both strains. When the efflux pump was inactivated, disruption of the *acrA* gene in the multidrug-resistant EcDC64 strain lead to a slight reduction in fitness (median CI for the Ec Δ acrA/EcDC64 competition, 0.42) compared with the more susceptible Jc194 strain, in which the inactivation of AcrA resulted in a marked decrease in fitness, as shown by the median CI of 0.15 for the Jc Δ acrA/Jc194 competition experiments. On the other hand, the lack of the TolC component had a similar effect on the fitness of both strains. The median CI value for Ec Δ tolC/EcDC64 competition was 0.24, and that for Jc Δ tolC/Jc194 competition was 0.32. The same trend was observed when the same isogenic pairs of isolates were analyzed by *in vivo* competition experiments performed in a mouse model of systemic infection. The results for these experiments are presented in Fig. 2. The lack of AcrA was significant and caused a decrease in the competitiveness of Ec Δ acrA (median CI for the Ec Δ acrA/EcDC64 competition, 0.3) and Jc Δ acrA (median CI for the Jc Δ acrA/Jc194 competition, 0.11). The CI values were slightly lower than those observed in the *in vitro* competition experiments. The fitness costs caused by inactivation of TolC (the median CI value for Ec Δ tolC/EcDC64 competition was 0.38, and for Jc Δ tolC/Jc194 competition it was 0.39) were almost identical in both strains. Compared with data

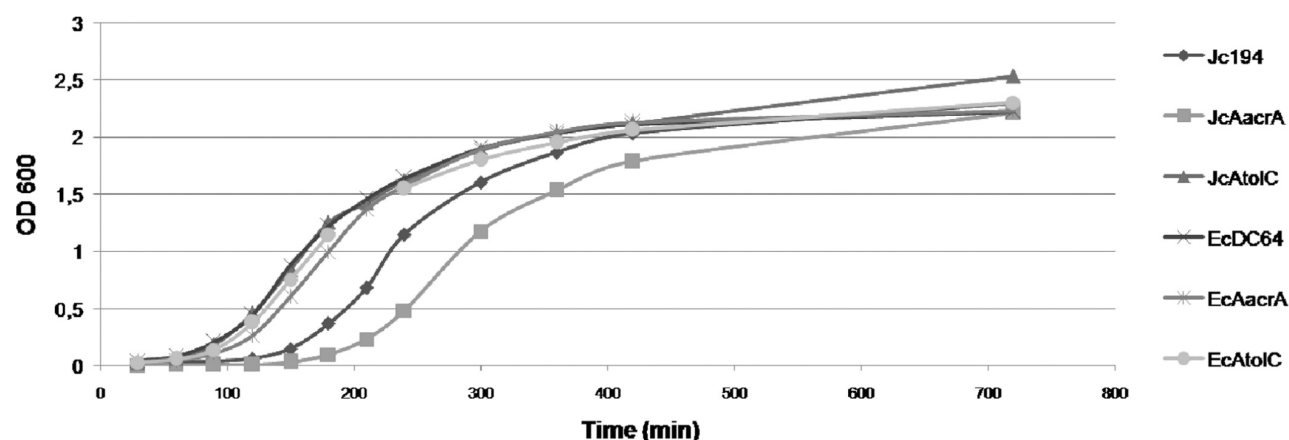


FIG 1 Growth curves for wild-type *E. cloacae* clinical isolates and their isogenic derivatives in LB medium. Data are mean values of three measurements. For simplification, error bars have been omitted, although in all cases the standard deviation was <10%.

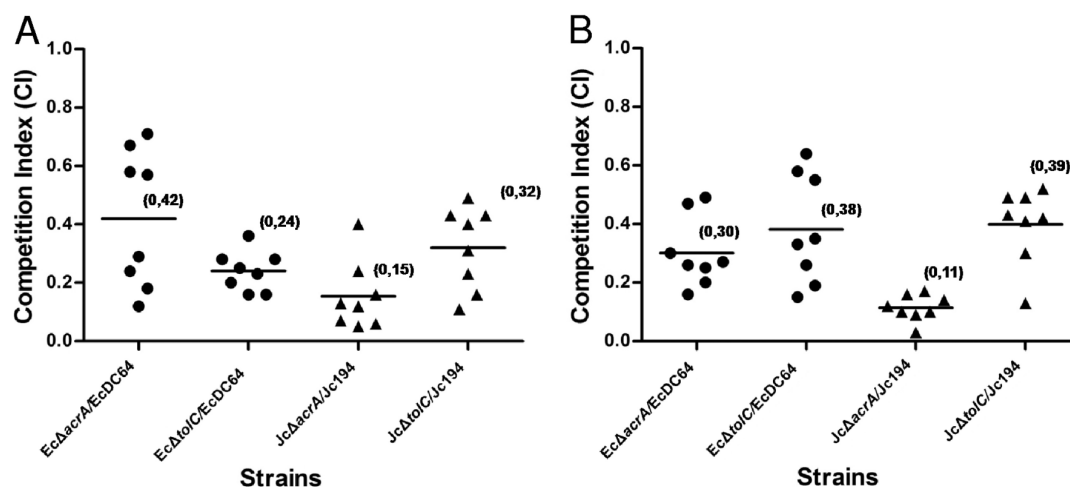


FIG 2 (A) Results of *in vitro* competition experiments. The experiments were performed in flasks of LB broth in which bacteria were grown at 37°C and 180 rpm for 16 to 18 h, corresponding to approximately 20 generations, as described in Materials and Methods. The CI values obtained for each of the eight independent experiments are plotted. The median CI values are shown in parentheses. (B) Results of *in vivo* competition experiments in the mouse model of systemic infection. Mice ($n = 8$ per group) were injected intraperitoneally with 1:1 mixtures of each of the mutant–wild-type pairs containing a total of approximately 2×10^6 exponentially growing cells. The number of bacterial cells in spleen homogenates was determined at 24 h postinfection. The median CI values are shown in parentheses.

from *in vitro* competition experiments, the role of TolC in the fitness of the Jc194 strain was almost identical. However, EcΔtolC was fairly much more competitive *in vivo* than *in vitro*. Together, these results indicate that AcrAB-TolC efflux pump is involved in the maintenance of biological competitiveness of *E. cloacae* in both environments, *in vitro* and *in vivo*, in a mouse model.

Virulence in a mouse model of systemic infection. The ability of the knockout strains to cause systemic infection in a mouse model was tested. To assess the effect on virulence of the inactivation of the *acrA* and *tolC* genes, 6 mouse groups were injected intraperitoneally with each of the different strains studied, EcDC64, EcΔacrA, EcΔtolC, Jc194, JcΔacrA, and JcΔtolC. The bacterial loads in spleen homogenates were determined at 24 h postinfection, as described above. As shown in Table 4, spleens from mice infected with *acrA* knockout strains presented significantly lower ($P < 0.0001$) bacterial loads than those infected with the wild-type strains. The same trend was observed when spleens from mice infected with EcΔtolC and JcΔtolC were analyzed. The ability of JcΔtolC to cause infection was slightly lower ($P = 0.0242$) than that of strain Jc194. In the case of mice infected with EcΔtolC, the bacterial load in the spleen decreased markedly ($P = 0.0003$) in the comparison with the decrease observed in the wild-type strain.

TABLE 4 Effect of AcrAB-TolC deficiency on *E. cloacae* systemic infection *in vivo*

| Strain ^a | Median CFU/g (range) ^b |
|---------------------|---|
| EcDC64 | 4.6×10^4 (8×10^3 – 1.3×10^5) |
| EcΔacrA::Km | 483.3 (75–980) |
| EcΔtolC::Km | 2.7×10^3 (1.3×10^3 – 5.2×10^3) |
| Jc194 | 1.8×10^7 (1.1×10^7 – 2.6×10^7) |
| JcΔacrA::Tc | 5.6×10^4 (7.4×10^3 – 9.9×10^4) |
| JcΔtolC::Km | 5.3×10^6 (1.7×10^5 – 1.2×10^7) |

^a Km, kanamycin; Tc, tetracycline.

^b The number of bacterial cells in the spleen was determined at 24 h postinfection.

DISCUSSION

The role of the AcrAB-TolC efflux pump in antimicrobial resistance has previously been described for some species of *Enterobacteriaceae* (30, 31). *Enterobacter cloacae* encodes an AcrAB-TolC system homologous to the system described in *Escherichia coli* (29). So far, most clinical studies on this type of system have focused on the involvement of these pumps in antibiotic resistance. However, few studies have examined the contributions of the pumps to bacterial fitness and virulence. In this study, the role of the AcrAB-TolC efflux pump in antibiotic resistance was analyzed by constructing mutant strains with *acrA* and *tolC* knockout genes in MDR EcDC64 and Jc194 clinical isolates. Inactivation of *acrA* led to an increase in the susceptibility to a range of antibiotics, relative to the wild-type strain, as previously reported (29). The MIC values conferred by JcΔacrA to antibiotics were generally similar to those of strain EcΔacrA, but in some cases an increase in susceptibility, relative to strain EcΔacrA, was observed, such as with oxacillin, erythromycin, and linezolid (Table 3). However, the MICs of ciprofloxacin, chloramphenicol, and tigecycline decreased more sharply when the *acrA* gene was inactivated in EcDC64, which may be related to higher levels of *acrAB* expression. In this study, only certain antibiotics were tested, as we have previously reported the susceptibility profile shown by AcrAB-TolC in *E. cloacae* (29).

Disruption of *tolC* also resulted in a moderate increase in antimicrobial susceptibility, although it did not affect the MIC of some antibiotics such as oxacillin and tetracycline, which revealed different functionalities between AcrA and TolC. The greatest increase in susceptibility was observed with the disruption of *acrA*. These data suggest the important role for the periplasmic adaptor AcrA in efflux efficiency. Studies in *Salmonella* spp. (3) have shown that there are differences in susceptibility patterns depending on which gene (*acrA*, *acrB*, or *tolC*) is inactivated and that the effect is substrate specific. In the present study, the most susceptible mutant to the antibiotic tested was the *acrA* mutant. The

differences in the resistance pattern by inactivating *acrA* or *tolC* may be partly explained by the reported promiscuity or redundancy of both proteins with other efflux pumps. Indeed, and according to our data, the function of AcrA is more restrictive and less redundant than that of the TolC protein. The possibility that another porin may assume the role of TolC in the efflux pump cannot be disregarded, in accordance with the data reported here.

The involvement of RND efflux pump proteins in pathogenicity has been studied in different bacteria. Species of *Salmonella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Neisseria* and others have shown that the lack of an AcrAB-TolC component has an effect on the maintenance of biological competitiveness and the ability to cause infection (2–6, 13, 14, 16, 19, 22, 25, 28, 36).

The goal of the present study was to determine how the lack of a functional AcrAB-TolC efflux system affects the fitness and virulence of *E. cloacae*, a microorganism that is increasing in importance because of the high level of resistance to antibiotics that it displays (12). It is widely assumed that *in vitro* resistance to antibiotic substrates of efflux pumps is predictive of fitness advantages in the presence of such molecules. However, during infection or colonization, bacteria do not always need to deal with an antimicrobial agent. For this reason, it can be interesting to analyze the fitness cost of a specific gene without the presence of a selective stimulus, such as a specific antimicrobial molecule. It appears that both *acrA* and *tolC* genes are key to the fitness of *E. cloacae* isolates, although some minor differences between both clinical isolates of AcrA and TolC were observed.

In regard to antibiotic resistance, deletion of the *acrA* gene was associated with a greater decrease in antibiotic MICs than those caused by deletion of the *tolC* gene (Table 3), thus emphasizing the importance of the AcrA protein in conferring resistance to several antimicrobial agents. With respect to competition experiments, abrogation of either AcrA or TolC was associated with a reduction in the CI both *in vitro* and *in vivo*, although the CI value of the JcΔ*acrA* strain was much lower than that of its isogenic wild-type pair. Overall, the data suggest that separate deletion of each component may have different physiological and biological impacts in bacterial cells, even though both AcrA and TolC proteins are components of the same efflux pump mechanism.

Consistent with these data, virulence assays with mouse *in vivo* experiments revealed lower bacterial loads in the spleens of mice infected with knockout strains than in those infected with wild-type strains. The *in vivo* attenuation observed in *acrA* mutants was more dramatic than that observed in *tolC* knockout strains.

In summary, we described here the use of specific knockouts to test the effects of the AcrAB-TolC efflux system on antibiotic resistance, fitness, and virulence in *E. cloacae*. We demonstrated that the components of this efflux pump not only are involved in resistance to a range of antibiotics but also play an important role in the maintenance of biological competitiveness and are required for the full virulence of *E. cloacae*.

The possibility that deletion of these genes may be important for attenuation of *E. cloacae* isolates as a putative vaccine strategy to combat bacterial infections deserves further attention.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by an Agustí Pumarola grant (SCMIMC and SEIMC), by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI081368, PS09/00687) and SERGAS (PS07/90), and by grants from the Xunta de Galicia (07CSA050916PR) to G.B.

A.P. and M.M. are in receipt of scholarships from REIPI (Spanish Network for Research in Infectious Diseases). A.F. is in receipt of a Rio Hortega research support contract from Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación. M.P.C. was supported by a doctoral grant (SFRH/BD/6474/2009). M.P. and S.R.-F. are in receipt of research contracts from the Xunta de Galicia (Programa Isidro Parga Pondal and Instituto de Salud Carlos III, respectively).

We thank COST Action BM0701 members for their helpful collaboration and advice.

REFERENCES

- Aranda J, et al. 2010. The cation-uptake regulators AdcR and Fur are necessary for full virulence of *Streptococcus suis*. *Vet. Microbiol.* **144**:246–249.
- Bina XR, Lavine CL, Miller MA, Bina JE. 2008. The AcrAB RND efflux system from the live vaccine strain of *Francisella tularensis* is a multiple drug efflux system that is required for virulence in mice. *FEMS Microbiol. Lett.* **279**:226–233.
- Blair JM, La Ragione RM, Woodward MJ, Piddock LJ. 2009. Periplasmic adaptor protein AcrA has a distinct role in the antibiotic resistance and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**:965–972.
- Buckley AM, et al. 2006. The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. *Cell Microbiol.* **8**:847–856.
- Bunikis I, et al. 2008. An RND-type efflux system in *Borrelia burgdorferi* is involved in virulence and resistance to antimicrobial compounds. *PLoS Pathog.* **4**:e1000009.
- Burse A, Weingart H, Ullrich MS. 2004. The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**:43–54.
- Chang AC, Cohen SN. 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**:1141–1156.
- Chaverroche MK, Ghigo JM, d'Enfert C. 2000. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* **28**:E97.
- Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:6640–6645.
- Elkins CA, Nikaido H. 2003. Chimeric analysis of AcrA function reveals the importance of its C-terminal domain in its interaction with the AcrB multidrug efflux pump. *J. Bacteriol.* **185**:5349–5356.
- Elkins CA, Nikaido H. 2002. Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops. *J. Bacteriol.* **184**:6490–6498.
- Fernández A, et al. 2011. Emergence in Spain of a multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* clinical isolate producing SFO-1 extended-spectrum beta-lactamase. *J. Clin. Microbiol.* **49**:822–828.
- Gil H, et al. 2006. Deletion of TolC orthologs in *Francisella tularensis* identifies roles in multidrug resistance and virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:12897–12902.
- Hirakata Y, et al. 2002. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Exp. Med.* **196**:109–118.
- Hirakawa H, Nishino K, Hirata T, Yamaguchi A. 2003. Comprehensive studies of drug resistance mediated by overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**:1851–1856.
- Jerse AE, et al. 2003. A gonococcal efflux pump system enhances bacterial survival in a female mouse model of genital tract infection. *Infect. Immun.* **71**:5576–5582.
- Kobayashi K, Tsukagoshi N, Aono R. 2001. Suppression of hypersensitivity of *Escherichia coli* acrB mutant to organic solvents by integrational activation of the acrEF operon with the IS1 or IS2 element. *J. Bacteriol.* **183**:2646–2653.
- Kobayashi N, Nishino K, Yamaguchi A. 2001. Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:5639–5644.
- Lin J, Sahin O, Michel LO, Zhang Q. 2003. Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and *in vivo* colonization of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* **71**:4250–4259.
- Lobedanz S, et al. 2007. A periplasmic coiled-coil interface underlying

- TolC recruitment and the assembly of bacterial drug efflux pumps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:4612–4617.
21. Martinez JL, et al. 2009. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 33:430–449.
22. Martins A, et al. 2009. pH modulation of efflux pump activity of multidrug resistant *Escherichia coli*: protection during its passage and eventual colonization of the colon. *PLoS One* 4:e6656.
23. Mikolosko J, Bobyk K, Zgurskaya HI, Ghosh P. 2006. Conformational flexibility in the multidrug efflux system protein AcrA. *Structure* 14:577–587.
24. Nagakubo S, Nishino K, Hirata T, Yamaguchi A. 2002. The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC. *J. Bacteriol.* 184:4161–4167.
25. Nishino K, Latifi T, Groisman EA. 2006. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* 59:126–141.
26. Nishino K, Yamada J, Hirakawa H, Hirata T, Yamaguchi A. 2003. Roles of TolC-dependent multidrug transporters of *Escherichia coli* in resistance to beta-lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3030–3033.
27. Nishino K, Yamaguchi A. 2002. EvgA of the two-component signal transduction system modulates production of the YhiUV multidrug transporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184:2319–2323.
28. Padilla E, et al. 2010. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:177–183.
29. Pérez A, et al. 2007. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the AcrAB-TolC efflux pump of *Enterobacter cloacae* and determination of its involvement in antibiotic resistance in a clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3247–3253.
30. Piddock LJ. 2006. Multidrug-resistance efflux pumps—not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:629–636.
31. Poole K. 2004. Efflux-mediated multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 10:12–26.
32. Rose RE. 1988. The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Res.* 16:355.
33. Sanders WE, Jr, Sanders CC. 1997. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:220–241.
34. Swick MC, Morgan-Linnell SK, Carlson KM, Zechiedrich L. 2011. Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:921–924.
35. Touzé T, et al. 2004. Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system. *Mol. Microbiol.* 53:697–706.
36. Warner DM, Shafer WM, Jerse AE. 2008. Clinically relevant mutations that cause derepression of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrC-MtrD-MtrE efflux pump system confer different levels of antimicrobial resistance and in vivo fitness. *Mol. Microbiol.* 70:462–478.
37. West SE, Schweizer HP, Dall C, Sample AK, Runyen-Janecky LJ. 1994. Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 148:81–86.

7.3. Artículo capítulo III.

Effect of the transcriptional activators SoxS, RobA and RamA on expression of the multidrug efflux pump AcrAB-TolC in *Enterobacter cloacae*.

Astrid Pérez¹, Margarita Poza¹, Jesús Aranda¹, Cristina Latasa², Francisco Javier Medrano³, María Tomás¹, Antonio Romero³, Iñigo Lasa² and Germán Bou¹

Servicio de Microbiología-Instituto de Investigación Biomédica, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña. A Coruña, Spain¹; Laboratory of Microbial Biofilms, Instituto de Agrobiotecnología, Universidad Pública de Navarra-CSIC. Pamplona, Spain²; Laboratorio de Cristalografía de Rayos-X e Ingeniería de Proteínas, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). Madrid, Spain³

Running title: Regulation of AcrAB-TolC in *E. cloacae*

Keywords: Enterobacteriaceae, knock-out, global regulators

***Corresponding author:**

Dr. Germán Bou

Servicio de Microbiología

Complejo Hospitalario Universitario A Coruña-INIBIC

Xubias s/n 3ªPlanta Ed Sur

15006 A Coruña, Spain

Phone +34-981 176087 Fax +34-981 176097

E-mail: German.Bou.Arevalo@sergas.es

Abstract

Control of membrane permeability is a key step in regulating the intracellular concentration of antibiotics. Efflux pumps confer innate resistance to a wide range of toxic compounds such as antibiotics, dyes, detergents and disinfectants in members of the Enterobacteriaceae. The AcrAB-TolC efflux pump is involved in multidrug resistance in *E. cloacae*. However, the underlying mechanism that regulates the system in this microorganism remains unknown. In *Escherichia coli*, transcription of *acrAB* is up-regulated under global stress conditions by proteins such as MarA, SoxS and Rob. In the present study, two different clinical isolates of *E. cloacae*, EcDC64 (MDR over-expressing the AcrAB-TolC efflux pump) and Jc194 (with basal AcrAB-TolC expression level) were used to determine whether similar global stress responses operate in *E. cloacae* and also to establish the molecular mechanisms underlying this response. A decrease in susceptibility to erythromycin, tetracycline, telithromycin, ciprofloxacin and chloramphenicol was observed in clinical isolate Jc194, and to a lesser extent in EcDC64, in the presence of salicylate, decanoate, tetracycline and paraquat. Increased expression of the *acrAB* promoter in the presence of the above described conditions was observed by flow cytometry and RT-PCR, by using a reporter fusion protein (GFP). The expression level of the AcrAB promoter decreased in *E. cloacae* EcDC64 derivatives deficient in SoxS, RobA and RamA. Accordingly, the expression level of the AcrAB promoter was higher in *E. cloacae* Jc194 strains overproducing *soxS*, *robA* and *ramA*. Overall, the data showed that SoxS, RobA and RamA regulators were associated with the up-regulation of *acrAB*, thus conferring antimicrobial resistance as well as a stress response in *E. cloacae*.

In summary, the regulatory proteins SoxS, RobA and RamA were cloned and sequenced for the first time in this species. The involvement of these proteins in conferring antimicrobial resistance through up-regulation of *acrAB* was demonstrated in *E. cloacae*.

Introduction

Enterobacter cloacae is an important nosocomial pathogen responsible for various infections, including sepsis, infections of the respiratory tract and urinary tract, wound infections and meningitis. Multiple antibiotic-resistant strains have caused outbreaks of infections in hospitals, usually in settings where seriously ill patients are housed, such as intensive care units. These “ICU bugs” cause significant morbidity and mortality, and infection management is complicated by resistance to multiple antibiotics (44).

Efflux pumps confer innate resistance to a wide range of toxic compounds such as antibiotics, dyes, detergents and disinfectants in members of the family Enterobacteriaceae (35, 36). Therefore, efflux pumps participate, at least partly, in the ability of bacteria to adapt to diverse environments, in drug resistance mechanisms and in bacterial pathogenesis.

Control of membrane permeability is a key step in regulating the intracellular concentration of antibiotics in Enterobacteriaceae. The expression of porins and efflux pump components is jointly controlled by several positive global regulators, which respectively decrease or enhance transcription of specific genes such as *acrAB* and *tolC*, directly or via a regulation cascade. The *acrAB* regulation mechanism must be examined to understand the physiological role of AcrAB. In *Escherichia coli*, expression of *acrAB* may be subjected to multiple levels of regulation, and it is locally modulated by the AcrR repressor (23). At a global level, AcrAB is controlled by stressful conditions and by regulators such as MarA, SoxS and Rob (37, 40). In addition to identifying the MarA/SoxS/Rob family, George *et al.* (13) also identified and characterized RamA, a member of the AraC/XylS family, for its role in conferring multidrug resistance (MDR) in *Klebsiella*. Most recently, the *ramA* gene was identified in *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* and *Salmonella typhimurium*, in which it may also be involved in MDR (9, 19, 52). These activators perform their function *via* binding to discrete but degenerate nucleotide sequences known as mar-, rob-, or sox boxes located in the upstream region of regulated genes (including *acrAB*) (14, 18, 25, 26, 30). The expression of each regulator is controlled differently. In *E. coli*, the *marA* transcription

is repressed by *marR* and de-repressed through binding by compounds such as salicylate (45). The level of *soxS* is controlled by the activator *soxR*, in contrast to the repressor activity of *marR* on *marA*. Activation of *soxR* by superoxides and redox cycling compounds, such as paraquat, induces expression of *soxS* and the subsequent induction of the *soxRS* regulon (11). Rob is an abundant protein that is expressed constitutively (3) and its activity is enhanced by decanoate (40). Regulation of *ramA* is provided locally by *ramR*, presumably through prevention of RamR binding to an operator sequence near *ramA* and the subsequent relaxation of RamR repression at the *ramA* promoter (1, 38). Furthermore, induction of *acrAB* by indole is regulated through RamA, independently of MarA, SoxS and Rob (30). The main goal of the present study was to investigate the regulation of *acrAB* as well as its activator-encoding genes *soxS*, *robA* and *ramA* isolated from *E. cloacae*, in the presence of different stress agents such as salicylate, decanoate, tetracycline and paraquat. In order to define this regulation system, the effect of inactivation or artificial over-expression of *soxS*, *robA* and *ramA* on the expression of *acrAB* and the multidrug resistance phenotype of *E. cloacae* was also investigated.

Material and Methods

Strains, culture media and plasmids

The laboratory strains and plasmids used in the study are listed in Table 1. The clinical isolates used were two strains of *Enterobacter cloacae*: EcDC64 and Jc194 (33, 34). Both strains were isolated from a patient admitted to the A Coruña University Hospital (Spain). *Escherichia coli* strain TG1 was used for cloning procedures. All strains used in the study were maintained at -80 °C in 15 % (vol/vol) glycerol until use. The strains were grown on MacConkey agar plates (Becton, Dickinson and Company, NJ), in Luria-Bertani (LB) broth, or on LB agar in the presence of 50 µg of ampicillin/mL, 25 µg of kanamycin/mL, 30 µg of chloramphenicol/mL, 4 µg of gentamicin/mL or 30 µg of tetracycline/mL, when necessary. Ten (10) mM of salicylate, 100 µM of paraquat or 10 mM of decanoate (all from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were added to LB agar and broth media, as required.

PCR amplification, sequencing and cloning of *soxS*, *robA*, and *ramA* efflux pump regulatory genes.

Genomic DNA from EcDC64 was extracted from overnight cultures at 37 °C by use of the Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA). The oligonucleotides used to isolate, amplify and clone the efflux pump regulatory genes are listed in Table 2. To isolate and amplify *soxS*, *robA* and *ramA*, oligonucleotides were designed on the basis of the previously reported nucleotide sequence of *Enterobacter* sp. strain 638 complete genome (GenBank accession code CP000653). The upstream region of these genes was amplified by using two consecutive random and specific primers. The partially random primer arb.1F (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNACGCCC) was used in the first PCR to amplify anonymous fragments of DNA in the upstream region of the regulator genes. PCR conditions were 94 °C for 3 min, followed by 5 cycles of 94 °C for 30 s, 30 °C for 30 s and 72 °C for 1 min, then 30 cycles of 94 °C for 30 s, 45 °C for 30 s and 72 °C for 1 min, and a final 5 min extension step at 72 °C. The DNA fragments generated were then used as a template for the second PCR in which the primer arb.2F (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC) was used. The reaction was performed under the same

conditions as the first PCR, except annealing was carried out at 55 °C. The PCR product was purified from the gel, by use of the Geneclean Kit (MP Biomedicals, Ohio, USA), and was then sequenced. Sequencing was carried out with a *Taq* DyeDeoxi- terminator cycle sequencing kit in an automatic DNA sequencer (377 ABIPrism; Perkin-Elmer). Specific oligonucleotides (Table 2) were designed from the sequences obtained to amplify each regulator with its own promoter. Amplicons were then cloned into the pCR-Blunt II-TOPO cloning vector, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Corporation, CA), to generate the recombinant plasmids named pTsoxS, pTrobA and pTramA (Table 1).

Construction of knock-out strains

Disruption of the *soxS*, *robA* and *ramA* genes in strain EcDC64 was performed by the method described by Datsenko and Wanner (10), with some modifications. The Red helper pKOBEG (kindly donated by J. M. Ghigo, Institut Pasteur, France) (Table 1) is a low-copy-number plasmid that contains a gene for chloramphenicol resistance, a temperature-sensitive origin of replication, and the Red system, which comprises an exonuclease and the β and γ functions of phage λ . The pKOBEG plasmid (Table 1) was introduced in the strain EcDC64 by heat shock, and transformants were selected on LB agar with chloramphenicol, after incubation for 24 h at 30 °C. One transformant carrying the Red helper plasmid was made electrocompetent. A selectable resistance gene was amplified by PCR from genomic DNA by use of primers including 5' extensions with homology for the *soxS*, *robA* and *ramA* genes listed in Table 2. The PCR product was used to disrupt the *soxS*, *robA* and *ramA* genes of strain EcDC64 by electroporation. Electroporation (25 μ F, 200 Ω and 2.5 kV) of the electrocompetent strains was carried out according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad Laboratories, Madrid, Spain), with 50 μ L of a cell suspension and 1 μ g of the purified and dialyzed PCR products. Dialysis was performed with 0.025 μ m nitrocellulose membranes (Millipore, Billerica, MA). Shocked cells were added to 1 mL of LB broth, incubated overnight at 30 °C, spread on LB agar containing kanamycin and incubated for 24 h at 30 °C. The mutant strains were then grown on LB agar containing kanamycin for 24 h at 44 °C and incubated overnight at 30 °C on LB agar containing kanamycin and chloramphenicol in order to test for loss of the helper plasmid.

Construction of transcriptional reporter fusion

The oligonucleotides listed in Table 2 were designed to amplify a fragment of 526 bp that contained 506 bp upstream and 21 bp downstream of the ATG of the *acrAB* operon from *E. cloacae* EcDC64. The PCR product was double-digested with *Bam*HI and *Nco*I, and fused to the gene encoding the green fluorescent protein (*acgfp1*) in the pACGFP1 vector (Table 1). The fragment containing the transcriptional fusion was amplified with specific oligonucleotides (Table 2), purified and digested with *Hind*III and *Bam*HI, and then ligated with the T4 DNA ligase (Promega Corporation, Madison, WI, USA) into a similarly digested pACYC184 expression vector to generate the recombinant plasmid named pGFP (Table 1). Fusion was sequenced in order to verify the DNA sequence.

Cloning procedures for complementation assays.

Recombinant plasmids were first constructed and then introduced in the knockout strains for complementation studies. For construction of these plasmids, universal primers M13 and M13Rv were used to amplify the *soxS*, *robA* and *ramA* genes under the control of their own promoter regions from the pTsoxS, pTrobA and pTramA recombinant vectors, respectively. The amplified DNA was purified, digested and then ligated with the T4 DNA ligase (Promega Corporation, Madison, WI, USA) into the pUCP24 expression vector (Table 1), previously digested with the same enzymes. The PCR fragments containing *soxS* and *ramA* genes were cloned between *Bam*HI and *Eco*RI sites, and the fragment containing the *robA* gene was cloned between the *Hind*III and *Pst*I sites. The accuracy of the construct was checked by restriction analysis.

Antibiotic susceptibility testing

The susceptibility of various strains to the following antibiotics was determined by the standard disk diffusion method (Becton, Dickinson and Company, NJ), on Mueller-Hinton agar (Tables 3 and 4): telithromycin, ciprofloxacin, erythromycin, chloramphenicol and tetracycline. The susceptibility to these antibiotics was also determined in the presence of the following compounds: salicylate (10 mM),

decanoate (10 mM), paraquat (100 μ M) and tetracycline (MICs for the strains tested) (Table 4).

Flow cytometry assays

To examine the effect of transcriptional regulators SoxS, RobA and RamA on the multidrug efflux pump AcrAB-TolC in *Enterobacter cloacae*, expression experiments were performed with GFP as a reporter. Single colonies of each bacterial strain (harbouring the pGFP plasmid) were inoculated into 10 mL of LB broth containing appropriate amounts of the selected antibiotics. After overnight incubation at 37 °C and 180 rpm, cultures were diluted 1:100 in LB medium. The cells were then incubated at 37 °C with continuous shaking until they reached an OD₆₀₀ of 0.4 and were then diluted 1:100 in 2 mL of 0.9 % saline solution. Induction experiments were performed to test the effects of sodium salicylate (SAL), sodium decanoate (DEC), paraquat (PQ) and tetracycline (TET) on *acrAB* expression. Ten mM of SAL, 10 mM of DEC, 0.1 mM of PQ or the MIC of TET were added to the cultures. Fluorescence analysis was performed with a FacsScan cytometer, and 50,000 cells were measured for each sample. The values obtained were calculated as fluorescence units relative to the control strain containing the reporter plasmid grown under the same conditions.

Real Time PCR experiments

Real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) was carried out to determine the expression levels of the *soxS*, *ramA* and *robA* regulator genes and the efflux components *acrA* and *acrB*. Specific primers designed from *soxS*, *ramA*, *robA*, *acrA* and *acrB* sequences (GenBank accession code: JQ727666 for *soxS* gene; JQ727667 for *robA* gene and JQ727668 for *ramA* gene) are listed in Table 2. Total RNA was isolated with the High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. The concentration of RNA was determined spectrophotometrically.

RNA (1 μ g) was reverse transcribed into single-stranded cDNA by use of a Transcriptor first-strand cDNA synthesis kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. cDNA was quantified by real-time PCR

amplification with specific primers (Table 2) by use of a Light Cycler 480 SYBR green I master kit and a Light Cycler 480 instrument (both from Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) with an initial incubation of 95 °C for 10 min followed by 45 cycles of 10 s at 95 °C, 20 s at 60 °C, and 10 s at 72 °C. In all cases, the expression levels were standardized relative to the transcription levels of *rpoB* (a housekeeping gene) for each isolate.

Cloning, over-expression and protein purification

Full-length *soxS*, *robA* and *ramA* genes were amplified by PCR from genomic DNA of EcDC64 strain with the primers listed in Table 2. A DNA fragment corresponding to the *robA* gene was cloned into the pET-28 expression vector (Novagen) between *NdeI* and *XhoI* restriction sites. The *soxS* and *ramA* genes were cloned to MBP (Maltose Binding Protein) into the pETM-44 expression vector (modified pET-24d, EMBL-made vector by Arie Geerlof) between *NcoI* and *HindIII* restriction sites. Fusion proteins with a His-Tag at the N-terminal region were expressed in conventional *E. coli* strain BL21 (DE3) cells grown in LB medium supplemented with 40 µg/mL kanamycin. Cells were grown at 37 °C until the OD_{600nm} reached 0.6. Protein expression was induced by addition of Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Calbiochem) to the culture, to a final concentration of 0.5 mM, and then incubated for 5-6 h at 37 °C. Cell cultures were harvested by centrifugation (6000 x *g*, 20 min, 4 °C). Cell pellets were resuspended in 10 mL of lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl) and sonicated in a Misonix S4000 Sonicator. Bacterial lysates were pelleted at 30000 *rpm* for 1 h at 4 °C in a 60Ti rotor (Beckman). The supernatant was loaded onto a His-Trap HP 5 mL column (GE Healthcare-Amersham Biosciences) equilibrated in binding buffer (10 mM Tris-HCl, 5 mM imidazole, 500 mM NaCl). The target proteins were eluted with 50 mL of elution buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM imidazole, 500 mM NaCl).

DNA mobility shift assays

Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were performed as previously described (2). The DNA promoter of the *acrA* gene was amplified by PCR from *E. cloacae* EcDC64

genomic DNA by use of suitable oligonucleotide primers (Table 2), and the purified PCR fragment was cloned into the pGEM-T vector (Promega). The presence of the desired promoter was confirmed by sequencing the DNA plasmid with the T7 and SP6 primers of the pGEM-T vector. A DNA probe was prepared by PCR amplification, with one of the primers labeled with digoxigenin (DIG) at its 5' end, and was then purified. DNA-protein reaction mixtures (20 μ L) containing 25 ng of a DIG-labeled DNA probe and SoxS, RamA or RobA proteins were incubated for 30 min at 37 °C in EMSA buffer containing 20 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM KCl, 5% (vol/vol) glycerol, 1 μ g bulk carrier sperm salmon DNA, 0.5 mM 1,4-dithiothreitol, 0.1 mg bovine serum albumin *per* mL. DNA-protein complexes were visualized by separation on a 5% non denaturing polyacrylamide gel (40 mM Tris-acetate) at 90 V for 3 h, and were then transferred to a Biodine B nylon membrane (Pall Gelman Laboratory). DIG-labeled DNA-protein complexes were detected by following the manufacturer's protocol (Roche).

Nucleotide sequence accession codes.

The GenBank accession codes for the nucleotide sequences determined in the present study are as follows: JQ727666 for *soxS* gene; JQ727667 for *robA* gene and JQ727668 for *ramA* gene.

RESULTS

Stressing compounds such as salicylate, decanoate, tetracycline and paraquat modify the resistance phenotype of *E. cloacae*.

To analyze the effect of salicylate, decanoate, tetracycline and paraquat on the resistance profile of *E. cloacae*, two clinical isolates of *E. cloacae* were used: EcDC64 and Jc194. *Enterobacter cloacae* EcDC64 was isolated from a patient admitted to the intensive care unit of the A Coruña University Hospital (NW Spain). The bacterial isolate displayed a MDR phenotype over-expressing the AcrAB-TolC efflux pump and lower permeability than strain Jc194 (with basal efflux pump expression level) (33, 34).

The resistance profile to several antibiotic families known to be good substrates for efflux pumps (such as macrolides, tetracyclines or quinolones) was determined in both strains, by the standard disk diffusion method, in the presence and absence of the different compounds studied (Table 3).

The effect of these compounds on the resistance profile of *E. cloacae* was evaluated, and the results revealed that the susceptibility to a number of antibiotics belonging to different antibiotic families was reduced in both wild type strains in response to the compounds. When the bacteria were incubated with salicylate and paraquat, a decrease in the susceptibility to all of the antibiotics was observed in both WT strains (Table 3). The effect of tetracycline on antibiotic resistance of EcDC64 was not clearly established because of the high level of tetracycline resistance shown by this clinical isolate. However, this antibiotic was the strongest inducer of resistance in *E. cloacae* strain Jc194. The inhibition zones were dramatically reduced for all antibiotics, which indicate a significant increase in the resistance of this strain to the antibiotics.

Sodium decanoate had a modest effect on the antibiotic resistance of strain Jc194. The susceptibility to all antibiotics, except chloramphenicol, was slightly decreased. However, the resistance profile of EcDC64 was not modified by incubation of this strain with sodium decanoate.

The intensity of the effect differed depending on the type of molecule (Table 3).

Analysis of *acrAB* expression in the presence of different stressing compounds.

Flow cytometry assays were performed with the WT strain Jc194, which showed a basal expression level of the AcrAB-TolC efflux pump and a susceptible profile of resistance. Fluorescence data for *E. cloacae* Jc194 cultures containing the fusion *acrAB* promoter-GFP gene were measured in the presence of 10 mM sodium salicylate, 10 mM sodium decanoate, 4 µg/mL of tetracycline and 0.1 mM paraquat. The results obtained are shown in Figure 1A. All of the compounds tested induced an increase in the fluorescence intensity, indicating that the AcrAB efflux pump was up-regulated in the presence of these compounds. The greatest increase in fluorescence was observed when *E. cloacae* strain Jc194 was incubated with tetracycline. A similar result was obtained in response to salicylate, although the increase in intensity was slightly lower. The compound that triggered the lowest expression of *acrAB* was sodium decanoate (Fig. 1A). To confirm the results of the *acrAB* expression levels obtained by flow cytometry experiments with GFP as a reporter, real time RT-PCR assays were also performed. The results of the RT-PCR-assays were found to be consistent with the flow cytometry data (Fig. 1B).

Role of SoxS, RobA and RamA regulating AcrAB-TolC efflux pump in response to different signals.

The *soxS*, *robA* and *ramA* genes from EcDC64 were first amplified by high-fidelity PCR, then cloned into the pCR-Blunt II-TOPO cloning vector, and finally sequenced. Sequence analysis showed that genes *soxS*, *robA*, and *ramA* from *E. cloacae* EcDC64, which were 327, 870, and 375 bp long, encoded for proteins containing 108, 289, and 124 amino acids, respectively. These proteins showed a high level of similarity with their homologues in other members of the Enterobacteriaceae family. When the sequences obtained were compared with the recently released genome of *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* ATCC 13047 (GenBank accession code NC_014121), the amino acid identity was 100 % for SoxS, and 99 % for RamA. RobA displayed 97 % amino acid identity with the respective homologue in *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* ATCC 13047. Moreover, the upstream region of these genes was amplified by using two consecutive random and specific primers, as described

above. Fragments of varying length (between 600 and 800 bp) were obtained. Analysis of the upstream region of *soxS* revealed the presence of the *soxR* gene. Assembly of the sequence of the entire *locus* revealed an organization similar to that described for other Enterobacteriaceae, with divergently transcribed *soxR* and *soxS* genes separated by an intergenic sequence of 98 bp. Amplification of the upstream region of *ramA* gene yielded an amplicon of *ca.* 700 bp containing the partial coding region of the *romA* gene.

In order to determine the different pathways activating the MDR *acrAB*-mediated phenotype, mRNA was extracted from *E. cloacae* Jc194 incubated in the presence of the compounds listed above, and the expression level of *soxS*, *robA* and *ramA* genes were measured by real time RT-PCR (Fig. 2). The results confirmed a high level of *soxS* expression under superoxide stress and showed that the sodium decanoate activates *robA* expression (Fig. 2). Furthermore, the *ramA* gene was over-expressed in *E. cloacae* Jc194 in the presence of tetracycline and salicylate (Fig. 2). Moreover, the expression level of *marA* gene was measured in the presence of salicylate and tetracycline, and the results obtained confirmed a high level of expression of *marA* gene by salicylate (data not shown).

Induction of *acrAB* by SoxS, RobA and RamA in *E. cloacae* Jc194.

To determine the effect of the regulatory proteins SoxS, RobA and RamA on the expression level of *acrAB*, fluorescence data of *E. cloacae* Jc194 cultures containing the *acrAB* promoter fused to the gene encoding for GFP protein were measured and quantified by flow cytometry.

The wild type strain Jc194 harbouring the recombinant plasmid pGFP (Table 1) was used as an experimental control that showed basal fluorescence intensity (fluorescence value 1). Each of the genes encoding regulatory proteins was cloned under the control of their own promoter in the pCR-Blunt II-TOPO cloning vector and introduced into the control strain Jc194 harbouring the recombinant plasmid pGFP (Table 1) in order to measure the fluorescence intensity emitted when each of the regulators was over-expressed.

The results obtained by flow cytometry experiments showed that the regulatory proteins SoxS, RobA and RamA induced the *acrAB* promoter, thus leading to a significant increase in fluorescence intensity (Fig. 3A). To confirm the results, the mRNA levels of *acrA* and *acrB* genes were measured by RT-PCR. The results of the RT-PCR-assays are consistent with the flow cytometry data (Fig. 3B).

Influence of SoxS, RobA and RamA on *acrAB* expression in *E. cloacae* EcDC64.

In order to understand the role of the regulatory proteins SoxS, RobA and RamA in the MDR phenotype mediated by the AcrAB-TolC efflux pump in EcDC64 strain, *soxS*, *robA* and *ramA* genes were inactivated in the wild type EcDC64 strain to generate mutant strains EcΔ*soxS*, EcΔ*robA* and EcΔ*ramA*. These knock-out derivatives were transformed with the recombinant plasmid (pGFP) carrying the transcriptional fusion of *acrAB* promoter-GFP gene. The WT EcDC64 strain was also transformed with pGFP to control for fluorescence intensity. Flow cytometry assays were performed with the WT strain and the knock-out derivatives harbouring the pGFP recombinant plasmid, and fluorescence data were measured and recorded to investigate the effect of each regulator on the expression level of *acrAB* from *E. cloacae* EcDC64. The results obtained are shown in Figure 4A. Inactivation of the *robA* gene, which is constitutively expressed (3), led to a significant reduction in the fluorescence intensity. The fluorescence intensity emitted by EcΔ*robA* was reduced by half relative to that observed in the WT strain EcDC64. However, when *soxS* and *ramA* genes were inactivated, the fluorescence intensity remained almost unchanged in comparison with that in the WT strain.

Complementation assays were performed to confirm the role of these regulatory proteins on *acrAB* expression. The *soxS*, *robA* and *ramA* genes were amplified under the control of their own promoter regions from the WT EcDC64 strain and cloned into the pUCP24 vector (conferring resistance to gentamycin) in order to transform strains EcΔ*soxS*, EcΔ*robA* and EcΔ*ramA*, respectively. The fluorescence activity of these cultures containing the pGFP recombinant plasmid was measured and quantified by flow cytometry. As expected, the fluorescence intensity was increased to varying degrees when the regulatory genes were expressed from a plasmid into the knock-out

derivates (Fig. 4A). Real time RT-PCR results confirmed the fluorescence data obtained by flow cytometry assays (Fig. 4B).

Role of the *soxS*, *robA* and *ramA* regulatory proteins on the antimicrobial resistance profile of *Enterobacter cloacae*.

The resistance profile to several antibiotic families known as good substrates for efflux pumps (such as macrolides, tetracyclines or quinolones) was determined in both strains by the standard disk diffusion method (Table 4). EcDC64 showed greater resistance or lower susceptibility to the antibiotics tested than strain Jc194, which is consistent with lower expression of AcrAB-TolC. Different approaches were used to determine the role of the regulatory proteins (SoxS, RobA and RamA) on the efflux mediated resistance profile.

First, the genes encoding regulatory proteins were over-expressed in *E. cloacae* isolate Jc194. The strains over-expressing *soxS*, *robA* and *ramA* became resistant to erythromycin, tetracycline and telithromycin, and showed lower susceptibility to ciprofloxacin. The clinical isolate Jc194 was resistant to chloramphenicol when *soxS* and *robA* were over-expressed, and showed reduced susceptibility to this antibiotic as a result of *ramA* over-expression. The strain harbouring the empty cloning vector showed no significant changes in the resistance profile relative to the WT strain (Table 4).

On the other hand, the lack of the regulatory protein SoxS led to an increase in susceptibility to all antibiotics tested, except for chloramphenicol where the inhibition zone determined by disk diffusion test remained unchanged relative to that observed for the WT strain. The MDR phenotype of isolate EcDC64 was restored or even increased for all antibiotics tested, except for tetracycline. The over-expression of *soxS* in EcΔ*soxS* led to partial restoration of the resistance to tetracycline by EcΔ*soxS*.

The same trend was observed in the isogenic EcΔ*robA* and EcΔ*ramA* isolates. The lack of RobA and RamA proteins had a similar effect on the resistance of EcDC64 isolate, with some exceptions (Table 4). For some antibiotics, such as tetracycline and ciprofloxacin, the increase in susceptibility was greater than that observed for EcΔ*soxS*.

Analysis of knock-out isogenic derivatives *EcΔrobA* and *EcΔramA* over-expressing the *robA* and *ramA* genes, respectively, showed that the resistance profile was similar to that of the EcDC64 clinical isolate, although the MDR phenotype was not fully restored, as also observed in *EcΔsoxS*.

Interestingly, the knock-out derivatives *EcΔsoxS*, *EcΔrobA* and *EcΔramA* containing the expression vector pUCP24 without any insertion were slightly more susceptible to the antibiotics than the other knock-out derivatives (Table 4).

Moreover, susceptibility testing was performed with WT strains Jc194 and EcDC64, and the knock-out derivatives from EcDC64 (Table 3) in order to evaluate the effect of the lack of each regulator on the resistance profile in the presence of stressing agents.

In general, *EcΔsoxS* showed increased antibiotic resistance in response to the presence of salicylate, sodium decanoate and tetracycline. However, the superoxide stress generated by paraquat did not stimulate an increase in the resistance in *soxS* defective strain EcDC64. The antibiotic susceptibility also increased when *EcΔsoxS* was incubated with paraquat (Table 3). The concentration used in this case was 50 μM, which allowed the growth of *EcΔsoxS* and susceptibility testing to be performed.

Analysis of antibiotic resistance profile of *EcΔrobA* mutant revealed that sodium decanoate, unlike salicylate, paraquat and tetracycline, was not able to induce an increase in the antibiotic resistance of the *robA* defective EcDC64 clinical isolate.

Finally, tetracycline only induced an increase in the resistance to erythromycin by the isogenic knock-out *EcΔramA*. Susceptibility to tetracycline was almost unchanged and increased susceptibility to telithromycin, ciprofloxacin and chloramphenicol was observed (Table 3). Although salicylate also induces over-expression of *ramA*, *EcΔramA* showed an increased antibiotic resistance in response to salicylate, due to the presence of a functional MarA regulator.

SoxS, RobA and RamA bind to upstream region of *acrA* gene

The aforementioned results indicate that SoxS, RobA and RamA activators play a major role in inducing *acrAB* expression in response to the presence of compounds such as salicylate, superoxides, decanoate or antibiotics such as tetracycline. To understand the regulation of *acrAB* by these regulatory proteins, electrophoretic mobility shift assays (EMSA) with SoxS, RobA and RamA were performed. Plasmids encoding the histidine-tagged proteins were constructed as described in Material and Methods. SoxS and RamA proteins were purified after being fused to MBP (Maltose Binding Protein) to enhance their solubility. The MBP was also purified for use as a control. The upstream region of *acrA* gene was amplified by PCR, and the fragment was incubated with each of the proteins. The three proteins, SoxS, RobA and RamA, from the *E. cloacae* EcDC64 isolate bound to the promoter of the *acrA* gene, as revealed by the shift in the gel migration, whereas MBP did not bind to the promoter (Fig. 5).

DISCUSSION

Multidrug efflux pumps are the major agents conferring drug resistance in bacteria. Several investigators have studied the important roles of the AcrAB-TolC efflux pump in bacterial drug resistance and virulence in *Enterobacteriaceae* (28, 35). The data currently available in *E. coli* and other *Enterobacteriaceae* show that multidrug efflux pumps are often expressed under precise and elaborate transcriptional control, including specific regulators such as AcrR, and global regulators such as MarA, SoxS and Rob. In *E. coli*, the transcriptional activators belonging to the AraC/XylS family interact with AcrAB and effectively enhance efflux (15). Because the AcrAB-TolC plays a predominant role in the intrinsic resistance of *Enterobacter cloacae* to a wide range of antibiotics, dyes, detergents and solvents as well as in bacterial fitness and virulence (33, 34), study of its regulation is of great importance in understanding the action of antibiotics and bactericidal agents in *E. cloacae* and many related organisms. The *mar*, *sox* and *rob* regulons are well-characterized regulatory systems in *E. coli* (4, 21, 32, 51). It is thought that influx and efflux in *E. cloacae* might be regulated in a similar way as in *E. coli*. Genomic analysis of *E. cloacae* EcDC64 revealed the presence of SoxS and RobA regulators, essentially identical to those in *E. coli*. The *ramA* regulon was found to show the same genetic organization as that observed in *Citrobacter* (41) and *Klebsiella* species (5), in which the *ramA* locus is composed by *romA* and *ramA* genes, both controlled by the RamR repressor. The DNA binding domains of SoxS, RobA and RamA proteins from EcDC64 share a high level of sequence identity, which suggests that these proteins have overlapping specificity. These regulators activate the transcription of a large set of promoters by binding to a degenerated and asymmetrical DNA sequence, known as *marbox* (24, 27). Analysis of the upstream region of the *acrAB* operon of *E. cloacae* (of both clinical isolates used in this study) revealed a *marbox* sequence in a suitable position. The results presented here demonstrate the importance of SoxS, RobA and RamA regulators in the modulation of AcrAB-TolC mediated antibiotic resistance in *E. cloacae*.

Functional genomics approaches such as knock-out studies or heterologous expression studies have been used to assess the effect of these transcriptional activators on *acrAB* expression. The *soxS*, *robA* and *ramA* knock-out strains derived from MDR *E. cloacae*

EcDC64 were constructed. The *soxS*, *robA* and *ramA* genes were also cloned into plasmids and over-expressed in the susceptible strain *E. cloacae* Jc194 under the control of their own promoter regions. The expression level of *acrAB* was measured by two different methods: flow cytometry using the *acrAB* promoter-GFP gene fusion as a reporter, and real time RT-PCR. In addition, susceptibility testing was performed with all the different strains obtained (in which *soxS*, *robA* and *ramA* were inactivated and over-expressed). Transcriptional activation of *acrAB* is the predominant cause of multidrug resistance in strains that over-express MarA or the closely related global regulators SoxS, RobA and RamA (6, 9, 12, 19, 20, 22, 31, 40, 43, 47, 51, 52). Chollet et al. (9) have described how an increase in *ramA*-mediated *acrAB* expression leads to an increase in resistance to tetracycline, chloramphenicol, quinolones and β -lactams in *E. aerogenes*. In the same way, Hornsey et al. (17) described the emergence of AcrAB-mediated tigecycline resistance in *E. cloacae* through the RamA regulator. Our findings demonstrated that increased levels of *soxS*, *robA* and *ramA* transcription activated *acrAB* expression, which led to an increase in antibiotic resistance in *E. cloacae* Jc194. The data indicated a correlation between the increased resistance to macrolides, tetracycline, ketolides, fluoroquinolones, and chloramphenicol and expression levels of *acrAB* and *soxS*, *robA* and *ramA*. The results of DNA mobility shift assays indicated that each of these three proteins directly control the expression of *acrAB* through binding to its upstream promoter region. Overall, the data indicated that SoxS, RobA and RamA activators play a major role as activators of AcrAB-TolC expression. Over-expression of *ramA* caused the highest *acrAB* gene expression, followed by over-expression of SoxS and to a lesser extent, RobA.

The differences in the *acrAB* expression levels were also illustrated by quinolone resistance in Jc194. The effects of RobA were generally weaker than those of RamA and SoxS for both antibiotic resistance and gene expression. In contrast to SoxS and RamA, RobA expression is constitutive (46), and it is inactive until activated by an induction signal (40, 42), which may explain the greater effect of the over-expressed *soxS* and *ramA* genes in the activation of the AcrAB-TolC efflux pump. On the other hand, the inactivation of the regulatory genes *soxS*, *robA* and *ramA* in *E. cloacae* ECDC64 led to increased susceptibility to all antibiotics tested, except for

chloramphenicol, in comparison with that of the WT strain, showing that the knock-out acquires a similar antibiotic resistance profile to drug-susceptible strain Jc194. However, only inactivation of the *robA* gene had a slight effect on *acrAB* expression, which was reduced by half. These data, supported by the results obtained in the susceptibility analysis, suggest that RobA plays an important role in the antibiotic resistance of *E. cloacae* EcDC64. Although the inactivation of *soxS* and *ramA* did not affect the expression of *acrAB*, these proteins also affected the antibiotic resistance of isolate EcDC64. This may be due to the level of expression of *soxS* and *ramA* genes, which was significantly lower than that of the *robA* gene. Therefore, the effect of inactivation of *soxS* and *ramA* on *acrAB* expression goes unnoticed when RobA is functional. In addition, these regulatory proteins control many other genes involved in antimicrobial resistance, which may explain the AcrAB-independent modification in the resistance profile of EcDC64 (27).

In *E. coli*, AcrAB-TolC is up-regulated in response to different signals, such as aromatic weak acids (salicylate), superoxides (generated by paraquat), bile salts, fatty acids (decanoate) and tetracycline (49). These toxic compounds activate the transcription of global regulators, and they cause up-regulation of the AcrAB-TolC efflux pump (11, 40, 45, 48). In the present study, we examined whether a similar mechanism occurs in *E. cloacae*. Indeed, the AcrAB-TolC system was up-regulated by salicylate, decanoate, paraquat and tetracycline, which affected the resistance profile of *E. cloacae*, as observed by a decreased susceptibility to a number of antibiotics. The results demonstrated that the induction profiles in *E. cloacae* are very similar to the induction profiles previously described in other species belonging to the Enterobacteriaceae family. The increased expression of *acrAB* was significantly correlated with the degree of resistance shown by *E. cloacae* Jc194 to different antibiotics, with some exceptions. Induction with tetracycline triggered the largest increase in resistance to all antibiotics tested. The lowest effect was observed after incubation of strain Jc194 with decanoate. The resistance to chloramphenicol was not modified in response to this compound. The increased levels of resistance to erythromycin, telithromycin and ciprofloxacin, which were shown by Jc194 in response to salicylate, paraquat and tetracycline, were similar, although the tetracycline had a greater effect on

tetracycline and chloramphenicol resistance. Bacteria must distinguish among different stress conditions and respond in an appropriate manner. Each activator is regulated in response to a different signal, causing the final induction of *acrAB*. As described above, the AcrAB-TolC efflux pump in *E. cloacae* is up-regulated by SoxS, RobA and RamA, causing an efflux-mediated MDR phenotype in *E. cloacae*. The present data revealed that *acrAB* from *E. cloacae* is activated through different pathways depending on the stimulus applied. Salicylate induced *ramA* expression, in addition to activating *marA* transcription, as previously described in *E. coli* (45). The *soxS* and *robA* expression was also moderately increased by salicylate in *E. cloacae*, unlike in *Salmonella*, in which *robA* is down-regulated (16). The expression data supported by the susceptibility testing results suggest that salicylate induces activation of the AcrAB-TolC efflux pump, mainly through the MarA regulator. In *E. coli*, tetracycline induces *marA*, *soxS* and *robA* expression, although the intensity of the effect differs (48). Tetracycline mediated similar adaptation mechanisms of increased efflux in *E. cloacae* but, unlike *E. coli*, it activated *ramA* expression instead of *marA*. The effect of tetracycline on *ramA* expression was greater than the effect on *soxS* and *robA*, suggesting that the RamA activator plays a key role in the AcrAB regulation network. This hypothesis was supported by the antibiotic resistance profile shown by the *ramA*-defective *E. cloacae* EcDC64 isolate, in which antibiotic resistance was not induced by tetracycline. Furthermore, *E. cloacae* showed a similar oxidative stress response to that described in *E. coli*, in which *soxS* is highly over-expressed and *robA* is down-regulated by paraquat (29), showing an increased resistance profile. However, the paraquat increased antibiotic susceptibility of *soxS*-defective *E. cloacae* EcDC64, which confirms the involvement of SoxS in the regulation of AcrAB under oxidative stress conditions. Rosenberg *et al.* (40) found that induction of *acrAB* by decanoate requires Rob, but not MarA or SoxS in *E. coli*. However, the decanoate down-regulated *robA* transcription and activated *marA* expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium (16). We found a model for the *acrAB* regulatory network in *E. cloacae* similar to that in *E. coli*. Decanoate was not able to induce an increase in the antibiotic resistance of *robA* defective EcDC64. Moreover, only RobA was up-regulated by decanoate, which suggests that it mediates the regulation of AcrAB by free fatty acids such as decanoate,

and it apparently helps the survival of *E. cloacae* by making it more resistant to antimicrobial agents.

In summary, the results of this study showed that the AraC/Xyls regulators SoxS, RobA and RamA play an important role in efflux mediated multidrug resistance in *E. cloacae*, by increasing *acrAB* expression. It was further demonstrated that each activator is regulated in response to a different signal, causing the final induction of *acrAB*. Therefore, the AcrAB-TolC efflux pump in *E. cloacae* is activated through different pathways depending on the stimulus applied, thus conferring resistance to a variety of antimicrobial agents.

Acknowledgements

This work was supported by “Ayudas a la Movilidad” (SEIMC), Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI081368, PS09/00687) and SERGAS (PS07/90) and grants from the Xunta de Galicia (07CSA050916PR) to G.B.

A.P. is in receipt of scholarships from REIPI (Spanish Network for Research in Infectious Diseases). M.P. is in receipt of a research contract from the Xunta de Galicia, Spain (Programa Isidro Parga Pondal). J.A. is in receipt of a “Sara Borrell” research support contract from Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación. M.T. was financially supported by the Miguel Servet Programme (C.H.U. A Coruña and ISCIII)

We thank COST Action BM0701 members for their helpful collaboration and advice.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in the present study.

| Strain or plasmid | Features (resistance marker) | Source or reference |
|------------------------------------|---|---------------------|
| Strains | | |
| <i>E. cloacae</i> EcDC64 | MDR phenotype strain overexpressing the AcrAB-TolC efflux pump | (33, 34) |
| <i>E. cloacae</i> Jc194 | Clinical isolate with basal efflux pump expression and a more susceptible resistance profile than strain EcDC64 | (33, 34) |
| EcΔsoxS::Km | EcDC64 with <i>soxS</i> gene disrupted with a kanamycin resistance marker | This study |
| EcΔrobA::Km | EcDC64 with <i>robA</i> gene disrupted with a kanamycin resistance marker | This study |
| EcΔramA::Km | EcDC64 with <i>ramA</i> gene disrupted with a kanamycin resistance marker | This study |
| <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) | <i>E. coli</i> cell suitable for transformation and protein purification | Invitrogen |
| <i>Escherichia coli</i> TG1 | Susceptible <i>E. coli</i> strain used for cloning procedures | Invitrogen |
| Plasmids | | |
| pACYC184 | Cloning vector (chloramphenicol and tetracycline) | (7, 39) |
| pAcGFP1 | Cloning vector (Ampicillin) | Clontech |
| pUCP24 | Cloning vector (gentamicin) | (50) |
| pKOBEG | Red helper plasmid (chloramphenicol) | (8) |
| pGFP | pACYC184 (chloramphenicol) containing <i>acrAB</i> promoter fused to the gene coding for GFP | This study |
| pCR-BluntII-TOPO | Cloning vector (kanamycin) | Invitrogen |
| pTsoxS | pCR-BluntII-TOPO (kanamycin) containing <i>soxS</i> gene under the control of its own promoter | This study |
| pTrobA | pCR-BluntII-TOPO (kanamycin) containing <i>robA</i> gene under the control of its own promoter | This study |
| pTramA | pCR-BluntII-TOPO (kanamycin) containing <i>ramA</i> gene under the control of its own promoter | This study |
| pUCsoxS | pUCP24 (gentamicin) containing <i>soxS</i> gene under the control of its own promoter | This study |
| pUCrobA | pUCP24 (gentamicin) containing <i>robA</i> gene under the control of its own promoter | This study |
| pUCramA | pUCP24 (gentamicin) containing <i>ramA</i> gene under the control of its own promoter | This study |
| pGEM-t | Cloning vector (Ampicillin) | Promega |
| pET-28 | Expression vector (kanamycin) | Novagen |
| pETM-44 | Modified pET-24d expression vector (kanamycin) | EMBL collection |

Table 2. Primers used in this study.

| Primer | Gene | Procedure | Sequence (5'→3') ^b |
|------------|-----------------------------------|-----------|---|
| sox-F | <i>soxS</i> ^a | Cloning | ATGTCNCATCAGCARATWATTCAG |
| sox-R | <i>soxS</i> | Cloning | TTAGTTGAGCTGGTGGCGGTA |
| soxUp | <i>soxS</i> | Cloning | CAGGGCCACCAGCGTGTGAATA |
| rob-F | <i>robA</i> | Cloning | ATGGATCAGGCTGGAATTATT |
| rob-R | <i>robA</i> | Cloning | TTAACGACGTACCGGAATCAG |
| robUp | <i>robA</i> | Cloning | GGTGACGTTTTTAACGTCCGGATCG |
| ram-F | <i>ramA</i> | Cloning | ATGATCAATCAGGAAGCTGA |
| ram-R | <i>ramA</i> ^a | Cloning | TCAGTSGYRCGRCTGTG |
| ramUp | <i>ramA</i> | Cloning | TTGTGCTGGCGAAACATACC |
| soxSKmF | <i>soxS</i> | Knock-out | ACCATTTCAATAGCCCGACTTCTGCGGACCACATCAATGTTCAACGGCTGGTCGATATGTTTCAT CAATCCATTCAATAC ATATGAATATCCTCCTTAG |
| soxSKmR | <i>soxS</i> | Knock-out | AGTGCCCTTCCGGCAATACGCCGAACGCGTCGCCGATGGTGGCCAGAGGAATGCCGATACGTTG CGCAATTTTAATGATC TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG |
| robAKmF | <i>robA</i> | Knock-out | GGCTATTCCAAGTGGCATCTGCAAAGGATGTTCAAGGATGTACCCGGTCATGCTATCGGTGCCTAT ATTCGCGCACGTCGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG |
| robAKmR | <i>robA</i> | Knock-out | AACGCGCATCTGATGGCGGAACCTCGGAGATCTGCTCCAGGGAGCAGGAGTAGCTCTGCGTGGT GCCGACCAGGTGCGTTT CATATGAATATCCTCCTTAG |
| ramAKmF | <i>ramA</i> | Knock-out | CTACACCAGCGGTTACGCATCGAAGAAATGCCCCGCCACGCGGGTTACTCAAAATGGCATTTACA GCGGCTGTTTATGCA TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG |
| ramAKmR | <i>ramA</i> | Knock-out | TGCGGGTAAACGTCGTGTCGAGTCAAACCCGTAGCGCAGGCAGATGTCGTACACCCGCTCGTC TGACTCACGCAGATCG C ATATGAATATCCTCCTTAG |
| pacrA-F | <i>acrAB</i> promoter | Cloning | TCAGCAACGAACTCACATTTATG |
| pacrA-R | <i>acrAB</i> promoter | Cloning | TAACCTCTGTTTTGTTTCATATGT |
| pacrAgfp-F | <i>pacrA::gfp</i> construction | Cloning | CCAACGAACTCACATTTATG |
| pacrAgfp-F | <i>pacrA::gfp</i> construction | Cloning | AGTCGCGGCCGCTCACTTGTACAGC |
| soxSpET44F | <i>soxS</i> | Cloning | <i>acatgt</i> CGCATCAGCAAATTATTCAG |
| soxSpET44R | <i>soxS</i> | Cloning | <i>aagctt</i> TTAGTTGAGCTGGTGGCGGT |
| ramApET44F | <i>ramA</i> | Cloning | <i>ccatgg</i> TCAATCAGGAAGCTGAAGGG |
| ramApET44R | <i>ramA</i> | Cloning | <i>aagctt</i> TCAGTGCAGCGGCTGTG |
| robApET28F | <i>robA</i> | Cloning | <i>catatg</i> GATCAGGCTGGAATTAT |
| robApET28R | <i>robA</i> | Cloning | <i>ctcgag</i> TTAACGACGTACCGGAATCA |
| acrA RT- F | <i>acrA</i> | RT-PCR | GCCTCTGGCGGTCTTCTGAT |
| acrA RT- R | <i>acrA</i> | RT-PCR | AGAGGTTCGGATTGAGCGTCAC |
| acrB RT- F | <i>acrB</i> | RT-PCR | GTGAGCGTCGAGAAATCGTCCA |
| acrB RT- R | <i>acrB</i> | RT-PCR | TACGGCTGATGGCGTCTTCAT |
| rpoB RT-F | <i>rpoB</i> ^a | RT-PCR | CAGCCGCGAYCAGGTTGACTACA |
| rpoB RT-R | <i>rpoB</i> | RT-PCR | GACGCACCGCAGGATACCACTG |
| soxS RT-F | <i>soxS</i> | RT-PCR | GCGCAGGTTACTGCTGGCAGCG |
| soxS RT-R | <i>soxS</i> | RT-PCR | GCGGCGAAACACGCGGGAAA |
| robA RT-F | <i>robA</i> | RT-PCR | CGCGCGGCCATTCTTGATA |
| robA RT-R | <i>robA</i> | RT-PCR | GAGTGCCGCGTCAACGAGA |
| ramA RT-F | <i>ramA</i> | RT-PCR | CAAAGGCGAAAGTCTGGGGCG |
| ramA RT-R | <i>ramA</i> | RT-PCR | CCCGTAGCGCAGGCAGATATCG |

^a Oligonucleotide degenerated where R is A or G; Y is C or T; S is C or G; W is T or A and N is A, T, C or G.

^b Nucleotides shown in lowercase italics indicate restriction sites for cloning

Table 3. Antibiotic susceptibility profiles, determined by the standard disk diffusion method, for the bacterial isolates in the presence of 10 mM sodium salicylate (SAL), 10 mM sodium decanoate (DEC), 0.1 mM paraquat (PQ) or 4 µg/mL of tetracycline (TET).

| Strains | Stimulus ^a | Antibiotics | | | | |
|---------|-----------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|-----------------|
| | | Erythromycin | Tetracycline | Telithromycin | Ciprofloxacin | Chloramphenicol |
| JC194 | - | 10 | 25 | 13 | 34 | 24 |
| | SAL | 0 | 18 | 9 | 28 | 21 |
| | DEC | 0 | 23 | 11 | 32 | 24 |
| | PQ | 0 | 18 | 8 | 27 | 17 |
| | TET | 0 | 11 | 8 | 27 | 11 |
| EcDC64 | - | 0 | 0 | 9 | 32 | 25 |
| | SAL | 0 | 0 | 0 | 28 | 21 |
| | DEC | 0 | 0 | 8 | 32 | 25 |
| | PQ | 0 | 0 | 0 | 27 | 18 |
| | TET | 0 | 0 | 0 | 32 | 24 |
| EcΔrobA | - | 10 | 26 | 14 | 38 | 24 |
| | SAL | 0 | 21 | 11 | 28 | 22 |
| | DEC | 10 | 26 | 13 | 46 | 33 |
| | PQ | 0 | 18 | 11 | 27 | 17 |
| | TET | 0 | 14 | 10 | 26 | 16 |
| EcΔsoxS | - | 9 | 23 | 14 | 34 | 24 |
| | SAL | 0 | 18 | 11 | 29 | 25 |
| | DEC | 8 | 22 | 12 | 32 | 25 |
| | PQ ^b | 10 | 31 | 17 | 42 | 28 |
| | TET | 0 | 16 | 11 | 29 | 15 |
| EcΔramA | - | 10 | 25 | 15 | 37 | 25 |
| | SAL | 0 | 19 | 12 | 28 | 23 |
| | DEC | 9 | 22 | 12 | 31 | 27 |
| | PQ | 0 | 18 | 12 | 32 | 18 |
| | TET | 0 | 24 | 17 | 40 | 26 |

^a Abbreviations : SAL, sodium salicylate; DEC, sodium decanoate; PQ, paraquat; TET, tetracycline.

^b Concentration of paraquat, 50 µM

Table 4. Antibiotic susceptibility profiles, expressed as diameters of the inhibition zones (in mm) determined by the standard disk diffusion method, for the bacterial isolates indicated.

| Antibiotic ^a | Susceptibility profile (diameter of inhibition zone in mm) for: | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|---|---------|-------------------|------------------|---------|-------------------|------------------|-------------------------|-------------------|------------------|-------|----------------|----------------|---------------------------------|
| | <i>E. cloacae</i> EcDC64 | | | | | | | <i>E. cloacae</i> Jc194 | | | | | | |
| | EcDC64 | EcΔsoxS | EcΔsoxS (pUCsoxS) | EcΔsoxS (pUCP24) | EcΔrobA | EcΔrobA (pUCrobA) | EcΔrobA (pUCP24) | EcΔramA | EcΔramA (pUCramA) | EcΔramA (pUCP24) | Jc194 | Jc194 (pTsoxS) | Jc194 (pTrobA) | Jc194 (pTramA) pTQ ^b |
| ERY | 0 | 9 | 0 | 9 | 10 | 0 | 10 | 10 | 0 | 11 | 10 | 0 | 0 | 8 |
| TET | 0 | 23 | 13 | 25 | 26 | 14 | 26 | 25 | 14 | 25 | 25 | 0 | 0 | 20 |
| TEL | 9 | 14 | 9 | 19 | 14 | 10 | 18 | 15 | 11 | 18 | 13 | 0 | 0 | 14 |
| CIP | 32 | 34 | 22 | 38 | 38 | 21 | 39 | 37 | 23 | 40 | 34 | 25 | 26 | 32 |
| CHL | 25 | 24 | 12 | 23 | 24 | 12 | 25 | 25 | 15 | 25 | 24 | 0 | 0 | 21 |

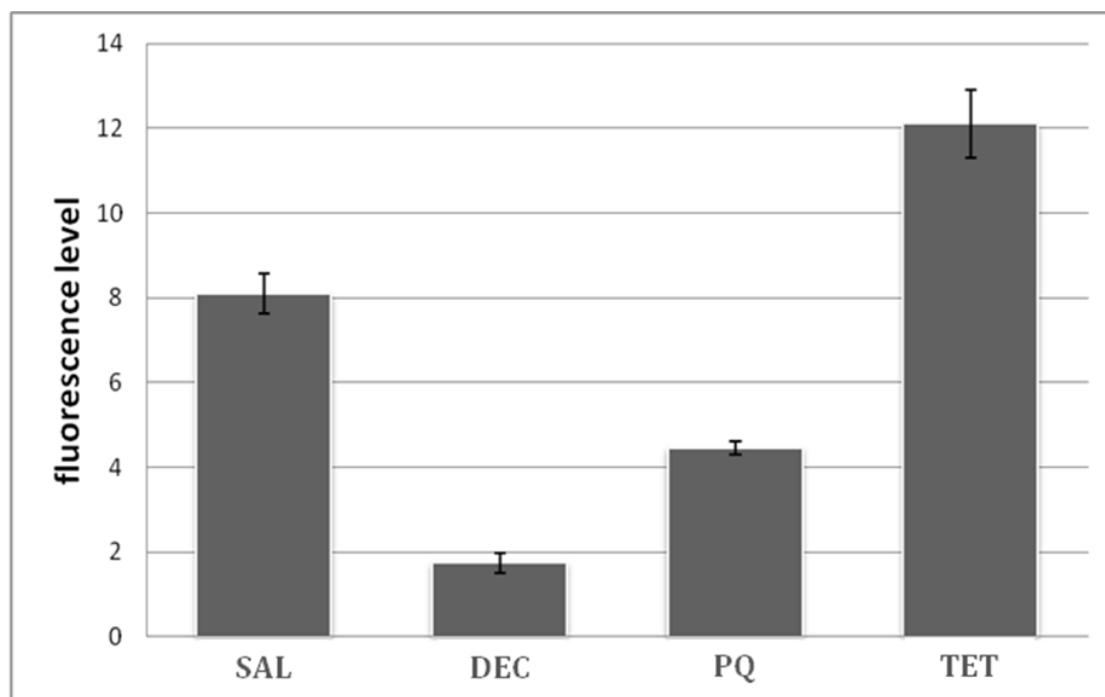


Figure 1 A. Induction of the *acrAB* operon measured by growing *E. cloacae* Jc194 containing the reporter plasmid pGFP in the presence of 10 mM sodium salicylate (SAL), 10 mM sodium decanoate (DEC), 0.1mM paraquat (PQ) and 4 $\mu\text{g/mL}$ of tetracycline (TET). The values shown are relative fluorescence units, comparative to the control strain, Jgfp, grown without the compounds. The bars show the average values from triplicate assays. P value < 0.05 in all cases.

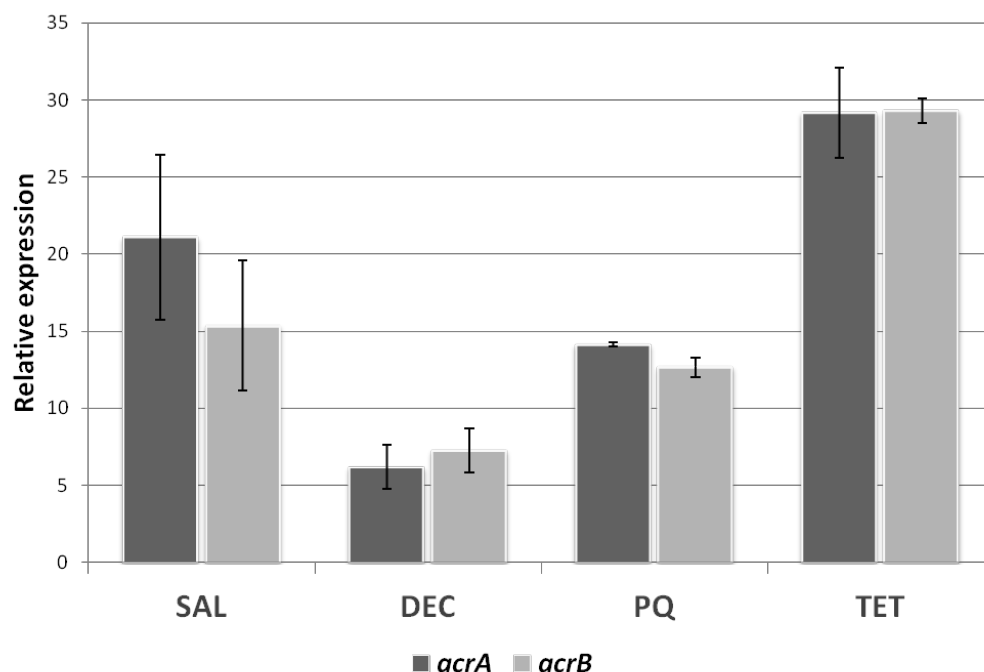


Figure 1 B. RT-PCR analysis of *acrA* and *acrB* gene expression in *E. cloacae* Jc194 in the presence of 10 mM sodium salicylate (SAL), 10 mM sodium decanoate (DEC), 0.1 mM paraquat (PQ), and 4 µg/mL tetracycline (TET). The bars show the average values for triplicate assays. Relative expression is calculated as $2^{-\Delta CT}$, where ΔCT is the ratio of the crossing points target value to the crossing point reference value. The target is the strain indicated, whereas the reference is *E. cloacae* Jc194 in all cases.

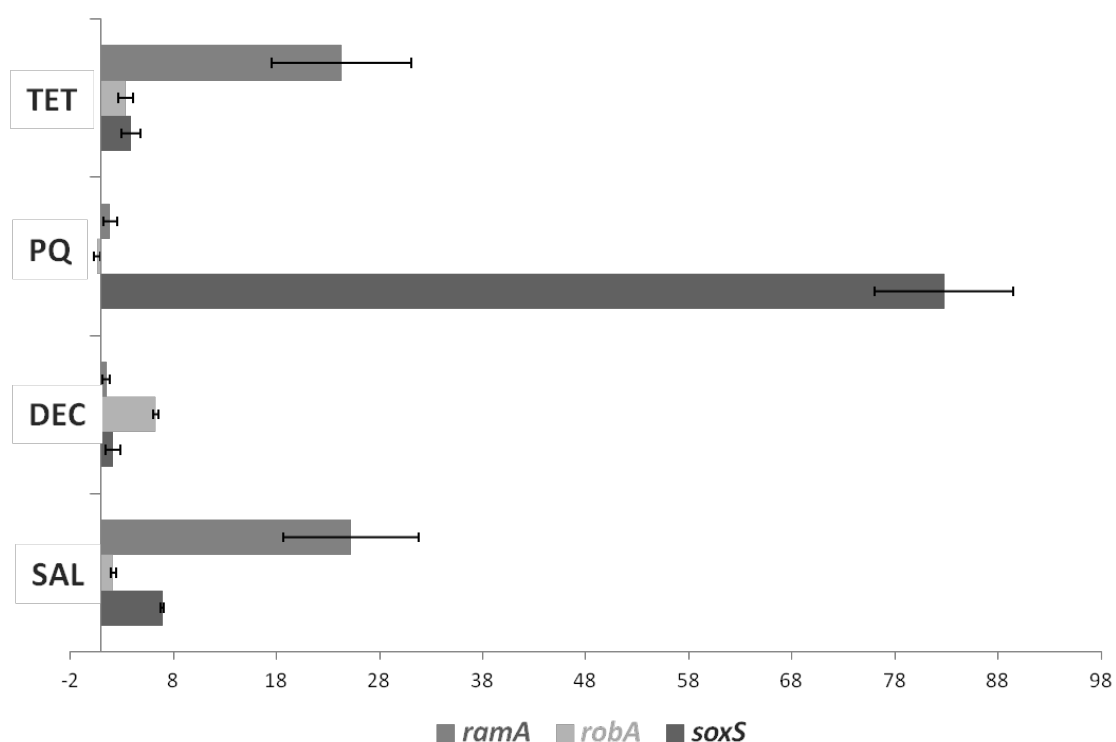


Figure 2. RT-PCR analysis of *soxS*, *robA* and *ramA* gene expression in *E. cloacae* Jc194 in the presence of 10 mM sodium salicylate (SAL), 10 mM sodium decanoate (DEC), 0.1 mM paraquat (PQ) and 4 µg/mL tetracycline (TET). The bars show the average values for triplicate assays. Relative expression was calculated as $2^{-\Delta CT}$, where ΔCT is the ratio of the crossing points target value to the crossing point reference value. The target is the strain indicated, whereas the reference is in all cases *E. cloacae* Jc194.

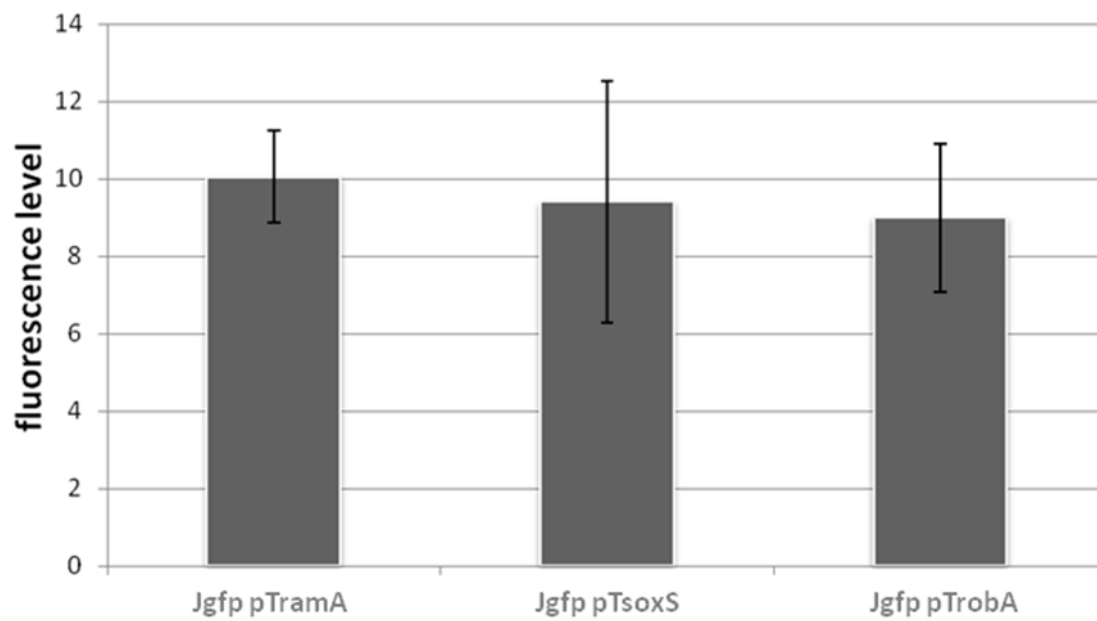


Figure 3 A. Induction of *acrAB* operon due to *ramA*, *soxS* and *robA* over-expression in *E. cloacae* Jc194 containing the reporter plasmid pGFP (see Material and Methods), Jgfp. The values shown are fluorescence units relative to the Jgfp control. The bars show the average values from triplicate assays. P value < 0. 05 in all cases.

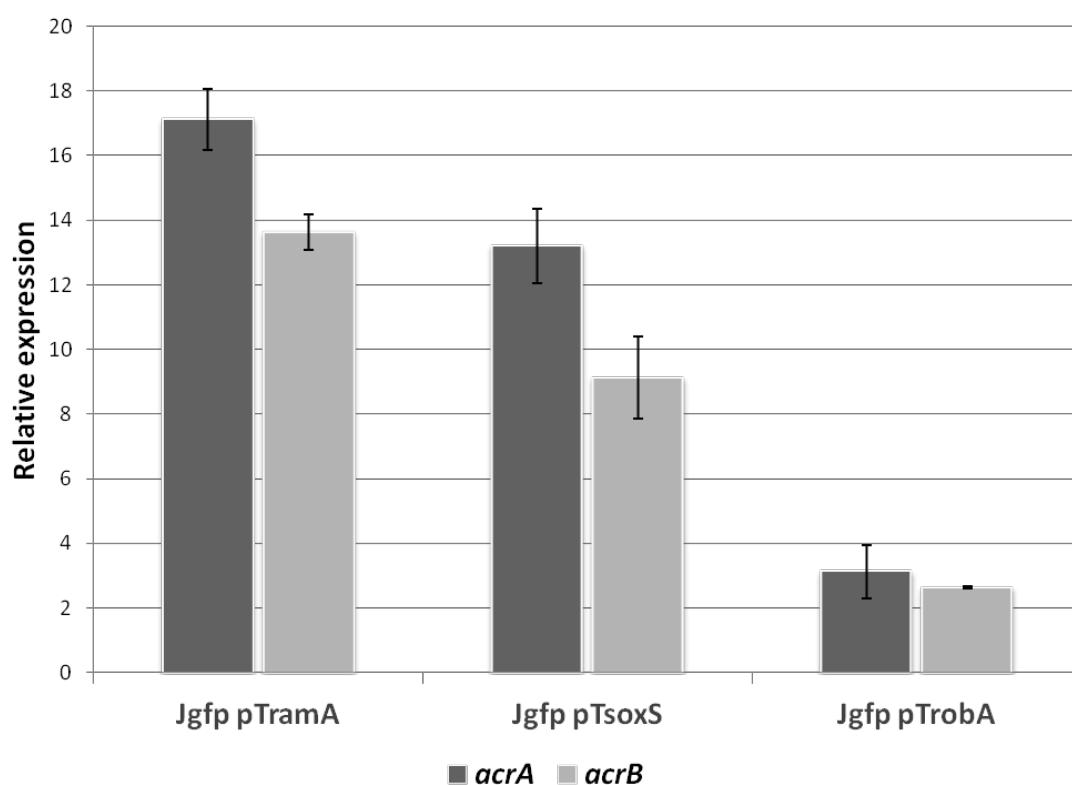


Figure 3 B. RT-PCR analysis of *acrA* and *acrB* gene expression in *E. cloacae* Jc194 over-expressing *ramA*, *soxS* and *robA*. The bars show the average values from triplicate assays. Relative expression is calculated as $2^{-\Delta CT}$, where ΔCT is the ratio of the crossing points target value to the crossing point reference value. The target is the indicated strains, whereas the reference is *E. cloacae* Jc194 in all cases.

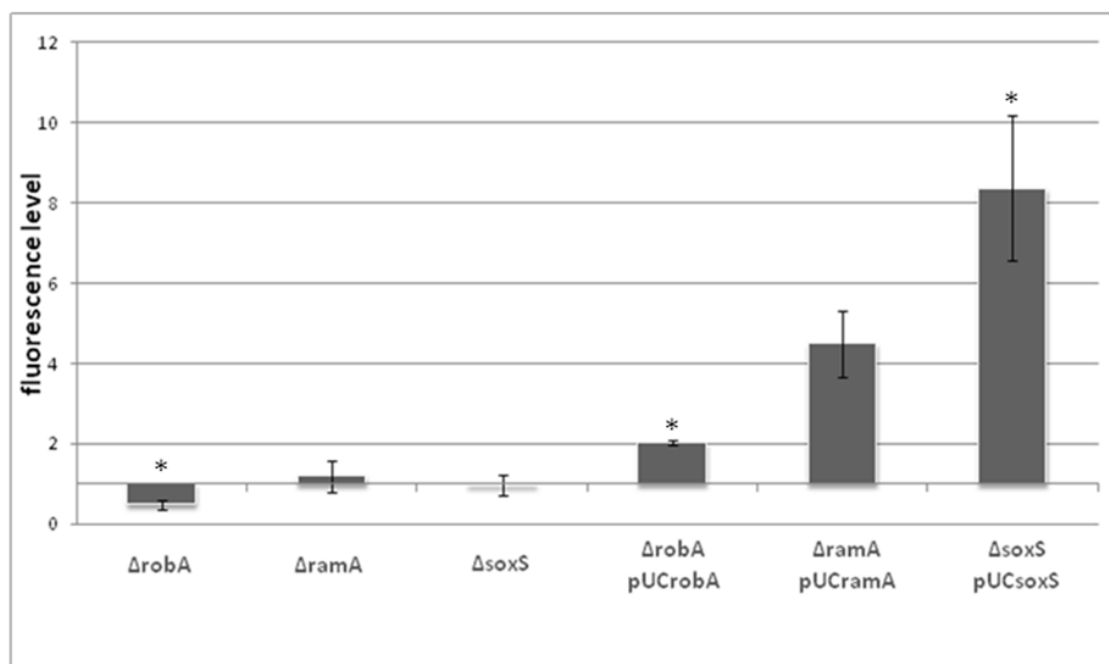


Figure 4 A. Level of expression of *acrAB* in knock-out strains from *E. cloacae* EcDC64 and their complemented strains. The values shown are fluorescence units relative to the EcDC64 wild type strain containing the reporter plasmid, pGFP. The bars show the average values from triplicate assays. * P-value <0.05.

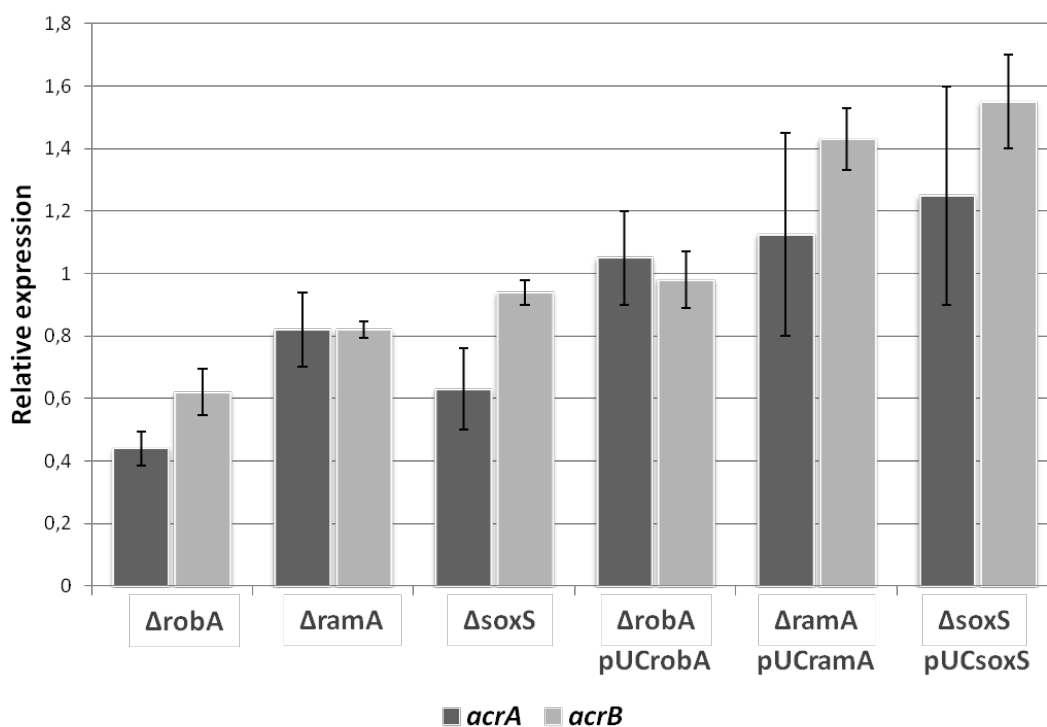


Figure 4 B. RT-PCR analysis of *acrA* and *acrB* gene expression in knock-out strains from *E. cloacae* EcDC64 and their complemented strains. The bars show the average values from triplicate assays. Relative expression is calculated as $2^{-\Delta CT}$, where ΔCT is the ratio of the crossing points target value to the crossing point reference value. The target is the indicated strains, whereas the reference is *E. cloacae* EcDC64 in all cases.

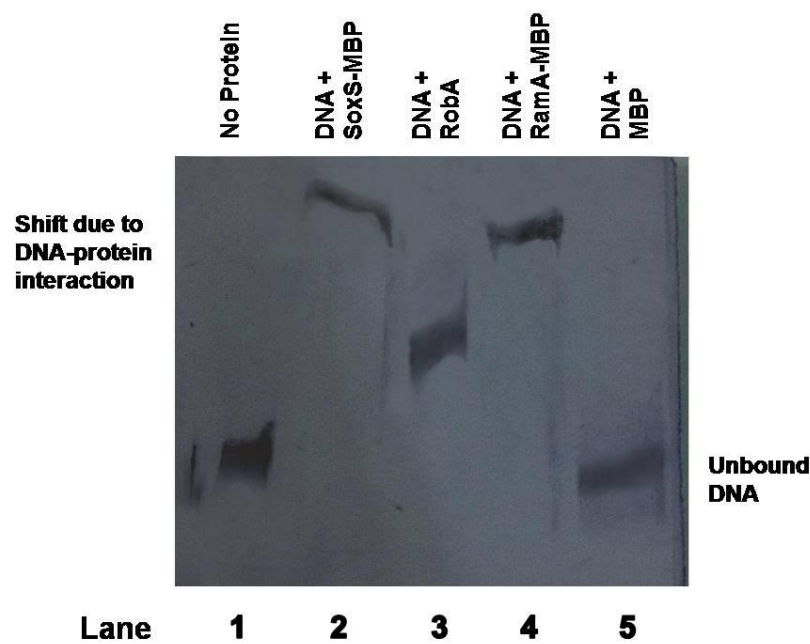


Figure 5. Electrophoretic mobility of the DNA fragments containing the EcDC64 upstream region of *acrA* gene from *E. cloacae* EcDC64. Lane 1, DIG-labelled DNA probe; lane 2, DIG-labelled DNA probe and SoxS protein fused to MBP; lane 3, DIG-labelled DNA probe and RobA protein; lane 4, DIG-labelled DNA probe and RamA protein fused to MBP; lane 5, DIG-labelled DNA probe and MBP protein.

References

1. **Abouzeed, Y. M., S. Baucheron, and A. Cloeckaert.** 2008. *ramR* mutations involved in efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:2428-34.
2. **Aranda, J., M. E. Garrido, P. Cortes, M. Llagostera, and J. Barbe.** 2008. Analysis of the protective capacity of three *Streptococcus suis* proteins induced under divalent-cation-limited conditions. *Infect Immun* **76**:1590-8.
3. **Azam, T. A., and A. Ishihama.** 1999. Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J Biol Chem* **274**:33105-13.
4. **Bennik, M. H., P. J. Pomposiello, D. F. Thorne, and B. Demple.** 2000. Defining a *rob* regulon in *Escherichia coli* by using transposon mutagenesis. *J Bacteriol* **182**:3794-801.
5. **Bialek-Davenet, S., E. Marcon, V. Leflon-Guibout, J. P. Lavigne, F. Bert, R. Moreau, and M. H. Nicolas-Chanoine.** In vitro selection of *ramR* and *soxR* mutants overexpressing efflux systems by fluoroquinolones as well as cefoxitin in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:2795-802.
6. **Bratu, S., D. Landman, A. George, J. Salvani, and J. Quale.** 2009. Correlation of the expression of *acrB* and the regulatory genes *marA*, *soxS* and *ramA* with antimicrobial resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* endemic to New York City. *J Antimicrob Chemother* **64**:278-83.
7. **Chang, A. C., and S. N. Cohen.** 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* **134**:1141-56.
8. **Chaverroche, M. K., J. M. Ghigo, and C. d'Enfert.** 2000. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* **28**:E97.
9. **Chollet, R., J. Chevalier, C. Bollet, J. M. Pages, and A. Davin-Regli.** 2004. RamA is an alternate activator of the multidrug resistance cascade in *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:2518-23.
10. **Datsenko, K. A., and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6640-5.
11. **Demple, B.** 1996. Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon--a review. *Gene* **179**:53-7.
12. **Fabrega, A., R. G. Martin, J. L. Rosner, M. M. Tavio, and J. Vila.** Constitutive SoxS expression in a fluoroquinolone-resistant strain with a truncated SoxR protein and identification of a new member of the *marA-soxS-rob* regulon, *mdtG*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:1218-25.
13. **George, A. M., R. M. Hall, and H. W. Stokes.** 1995. Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae*: a novel gene, *ramA*, confers a multidrug resistance phenotype in *Escherichia coli*. *Microbiology* **141** (Pt 8):1909-20.
14. **Griffith, K. L., and R. E. Wolf, Jr.** 2001. Systematic mutagenesis of the DNA binding sites for SoxS in the *Escherichia coli* *zwf* and *fpr* promoters: identifying nucleotides required for DNA binding and transcription activation. *Mol Microbiol* **40**:1141-54.
15. **Grkovic, S., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 2001. Transcriptional regulation of multidrug efflux pumps in bacteria. *Semin Cell Dev Biol* **12**:225-37.
16. **Hartog, E., L. Ben-Shalom, D. Shachar, K. R. Matthews, and S. Yaron.** 2008. Regulation of *marA*, *soxS*, *rob*, *acrAB* and *micF* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiol Immunol* **52**:565-74.
17. **Hornsey, M., M. J. Ellington, M. Doumith, G. Scott, D. M. Livermore, and N. Woodford.** Emergence of AcrAB-mediated tigecycline resistance in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* during ciprofloxacin treatment. *Int J Antimicrob Agents* **35**:478-81.
18. **Jair, K. W., X. Yu, K. Skarstad, B. Thony, N. Fujita, A. Ishihama, and R. E. Wolf, Jr.** 1996. Transcriptional activation of promoters of the superoxide and multiple antibiotic resistance regulons by Rob, a binding protein of the *Escherichia coli* origin of chromosomal replication. *J Bacteriol* **178**:2507-13.
19. **Keeney, D., A. Ruzin, and P. A. Bradford.** 2007. RamA, a transcriptional regulator, and AcrAB, an RND-type efflux pump, are associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Enterobacter cloacae*. *Microb Drug Resist* **13**:1-6.

20. **Kehrenberg, C., A. Cloeckaert, G. Klein, and S. Schwarz.** 2009. Decreased fluoroquinolone susceptibility in mutants of *Salmonella* serovars other than Typhimurium: detection of novel mutations involved in modulated expression of *ramA* and *soxS*. *J Antimicrob Chemother* **64**:1175-80.
21. **Koutsolioutsou, A., S. Pena-Llopis, and B. Demple.** 2005. Constitutive *soxR* mutations contribute to multiple-antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2746-52.
22. **Lee, E. H., E. Collatz, I. Podglajen, and L. Gutmann.** 1996. A *rob*-like gene of *Enterobacter cloacae* affecting porin synthesis and susceptibility to multiple antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:2029-33.
23. **Ma, D., M. Alberti, C. Lynch, H. Nikaido, and J. E. Hearst.** 1996. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol Microbiol* **19**:101-12.
24. **Martin, R. G., W. K. Gillette, S. Rhee, and J. L. Rosner.** 1999. Structural requirements for *marbox* function in transcriptional activation of *mar/sox/rob* regulon promoters in *Escherichia coli*: sequence, orientation and spatial relationship to the core promoter. *Mol Microbiol* **34**:431-41.
25. **Martin, R. G., W. K. Gillette, and J. L. Rosner.** 2000. Promoter discrimination by the related transcriptional activators MarA and SoxS: differential regulation by differential binding. *Mol Microbiol* **35**:623-34.
26. **Martin, R. G., K. W. Jair, R. E. Wolf, Jr., and J. L. Rosner.** 1996. Autoactivation of the *marRAB* multiple antibiotic resistance operon by the MarA transcriptional activator in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**:2216-23.
27. **Martin, R. G., and J. L. Rosner.** 2002. Genomics of the *marA/soxS/rob* regulon of *Escherichia coli*: identification of directly activated promoters by application of molecular genetics and informatics to microarray data. *Mol Microbiol* **44**:1611-24.
28. **Martinez, J. L., M. B. Sanchez, L. Martinez-Solano, A. Hernandez, L. Garmendia, A. Fajardo, and C. Alvarez-Ortega.** 2009. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **33**:430-49.
29. **Michan, C., M. Manchado, and C. Pueyo.** 2002. SoxRS down-regulation of *rob* transcription. *J Bacteriol* **184**:4733-8.
30. **Nikaido, E., A. Yamaguchi, and K. Nishino.** 2008. AcrAB multidrug efflux pump regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in response to environmental signals. *J Biol Chem* **283**:24245-53.
31. **O'Regan, E., T. Quinn, J. M. Pages, M. McCusker, L. Piddock, and S. Fanning.** 2009. Multiple regulatory pathways associated with high-level ciprofloxacin and multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar enteritidis: involvement of RamA and other global regulators. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:1080-7.
32. **Oethinger, M., I. Podglajen, W. V. Kern, and S. B. Levy.** 1998. Overexpression of the *marA* or *soxS* regulatory gene in clinical topoisomerase mutants of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:2089-94.
33. **Perez, A., D. Canle, C. Latasa, M. Poza, A. Beceiro, M. Tomas Mdel, A. Fernandez, S. Mallo, S. Perez, F. Molina, R. Villanueva, I. Lasa, and G. Bou.** 2007. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the AcrAB-TolC efflux pump of *Enterobacter cloacae* and determination of its involvement in antibiotic resistance in a clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:3247-53.
34. **Perez, A., M. Poza, A. Fernandez, M. D. Fernandez, S. Mallo, M. Merino, S. Rumbo-Feal, M. P. Cabral, and G. Bou.** Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness and virulence of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*.
35. **Piddock, L. J.** 2006. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* **4**:629-36.
36. **Poole, K.** 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* **10**:12-26.
37. **Randall, L. P., and M. J. Woodward.** 2002. The multiple antibiotic resistance (*mar*) locus and its significance. *Res Vet Sci* **72**:87-93.

38. **Ricci, V., and L. J. Piddock.** 2009. Only for substrate antibiotics are a functional AcrAB-TolC efflux pump and RamA required to select multidrug-resistant *Salmonella Typhimurium*. *J Antimicrob Chemother* **64**:654-7.
39. **Rose, R. E.** 1988. The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Res* **16**:355.
40. **Rosenberg, E. Y., D. Bertenthal, M. L. Nilles, K. P. Bertrand, and H. Nikaido.** 2003. Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. *Mol Microbiol* **48**:1609-19.
41. **Rosenblum, R., E. Khan, G. Gonzalez, R. Hasan, and T. Schneiders.** Genetic regulation of the *ramA* locus and its expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents* **38**:39-45.
42. **Rosner, J. L., B. Dangi, A. M. Gronenborn, and R. G. Martin.** 2002. Posttranscriptional activation of the transcriptional activator Rob by dipyriddy in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**:1407-16.
43. **Ruzin, A., M. A. Visalli, D. Keeney, and P. A. Bradford.** 2005. Influence of transcriptional activator RamA on expression of multidrug efflux pump AcrAB and tigecycline susceptibility in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1017-22.
44. **Sanders, W. E., Jr., and C. C. Sanders.** 1997. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol Rev* **10**:220-41.
45. **Seoane, A. S., and S. B. Levy.** 1995. Characterization of MarR, the repressor of the multiple antibiotic resistance (*mar*) operon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**:3414-9.
46. **Skarstad, K., B. Thony, D. S. Hwang, and A. Kornberg.** 1993. A novel binding protein of the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J Biol Chem* **268**:5365-70.
47. **Tanaka, T., T. Horii, K. Shibayama, K. Sato, S. Ohsuka, Y. Arakawa, K. Yamaki, K. Takagi, and M. Ohta.** 1997. RobA-induced multiple antibiotic resistance largely depends on the activation of the AcrAB efflux. *Microbiol Immunol* **41**:697-702.
48. **Viveiros, M., M. Dupont, L. Rodrigues, I. Couto, A. Davin-Regli, M. Martins, J. M. Pages, and L. Amaral.** 2007. Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. *PLoS One* **2**:e365.
49. **Viveiros, M., A. Jesus, M. Brito, C. Leandro, M. Martins, D. Ordway, A. M. Molnar, J. Molnar, and L. Amaral.** 2005. Inducement and reversal of tetracycline resistance in *Escherichia coli* K-12 and expression of proton gradient-dependent multidrug efflux pump genes. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3578-82.
50. **West, S. E., H. P. Schweizer, C. Dall, A. K. Sample, and L. J. Runyen-Janecky.** 1994. Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **148**:81-6.
51. **White, D. G., J. D. Goldman, B. Demple, and S. B. Levy.** 1997. Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**:6122-6.
52. **Zheng, J., S. Cui, and J. Meng.** 2009. Effect of transcriptional activators RamA and SoxS on expression of multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF in fluoroquinolone-resistant *Salmonella Typhimurium*. *J Antimicrob Chemother* **63**:95-102.

7.4. Curriculum Vitae.

Astrid Pérez Gómez

| INFORMACIÓN PERSONAL | | DATOS DE CONTACTO: | |
|----------------------|--------------------|--------------------|---|
| Nombre: | Astrid Pérez Gómez | Telf: | +34 649413395 |
| Nacionalidad: | Española | Email: | astrid.perez.gomez@sergas.es |
| Año de nacimiento: | 1980 | Dirección: | Avd. da Pasaxe, 34 2º F 15006 A Coruña (Spain) |

Experiencia profesional:

| | |
|-----------------|---|
| Oct 05 – | Investigadora Predoctoral C.H.U. A Coruña. A Coruña. España Servicio de Microbiología – Instituto de Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC) <ul style="list-style-type: none"> Desarrollo de la tesis doctoral titulada: “Implicación de la bomba de expulsión AcrAB-TolC en la resistencia y virulencia del microorganismo patógeno <i>Enterobacter cloacae</i>”. |
| Dic 03 – May 04 | Estudiante en Prácticas Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela. España Departamento de Microbiología y Parasitología <ul style="list-style-type: none"> Preparación de material y medios de cultivo para bacteriología. Técnicas de aislamiento e identificación de bacterias patógenas en peces |
| Jun 03 – Oct 03 | Estudiante en Prácticas Hospital de Meixoeiro. Vigo. España Servicio de Microbiología <ul style="list-style-type: none"> Preparación de material y medios de cultivo para bacteriología. Técnicas de detección fenotípica de microorganismos que causan infecciones hospitalarias. Técnicas de tipificación molecular de microorganismos que causan brotes hospitalarios. |

Educación:

| | |
|-----------|---|
| 2005-2007 | Diploma de Estudios Avanzados (DEA). Programa de Doctorado de Genética, Bioquímica y Biotecnología. Facultad de Biología (Universidad de A Coruña) Departamento de Biología Celular y Molecular <ul style="list-style-type: none"> Técnicas de determinación estructural de proteínas y ácidos nucleicos, regulación de la expresión génica, epidemiología molecular, bases moleculares de la resistencia a antibióticos. |
| 1998-2004 | Licenciada en Biología Facultad de Biología (Universidad de Santiago de Compostela) <ul style="list-style-type: none"> Citología animal y vegetal, bioquímica, microbiología, genética, fisiología animal y vegetal, biología del desarrollo, inmunología, biología celular, regulación metabólica, virología, genética evolutiva, bioquímica clínica y patología molecular, ingeniería genética y biotecnología, neurobiología. |

Cursos y Estancias:

Mar 11-Jun 11 **Purificación de proteínas reguladoras de la bomba de expulsión AcrAB-TolC de *Enterobacter cloacae***

Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid. España
Grupo de Biología Estructural de Proteínas

- Clonación y expresión de proteínas en diferentes vectores de acuerdo a las necesidades.
- Solubilización y purificación de proteínas reguladoras usando diferentes aproximaciones.

Jun 09-Dic 09 **Construcción de cepas *knock-out* en *Enterobacter cloacae***

Instituto de agrobiotecnología. Universidad Pública de Navarra, Pamplona. España
Grupo de *biofilm* microbianos

- Preparación de células electrocompetentes. Métodos de optimización.
- Construcción de cepas *knock-out* mediante inserción génica usando el método descrito por Datsenko y Wanner.
- Construcción de cepas *knock-out* por delección génica

Oct 05-May 06 **Curso de Adaptación Pedagógica (CAP)**

Universidad de A Coruña, España

- Configuración del Sistema Educativo
- Técnicas y metodologías para aumentar la interacción en educación.
- Prácticas en enseñanza.

Participación en Proyectos de Investigación:

- Referencia: G03/75. **Red de estudio de la Infección en el trasplante. Fondo de Investigaciones Sanitarias. 2003-2005. IP: Germán Bou.**
- Referencia: PI040514. **Estudios estructura-función de beta-lactamasas clase C. Fondo de Investigaciones Sanitarias. 2004-2006. IP: Germán Bou.**
- Referencia: PS07/90. **Estudio de Resistencia Antibiótica, Virulencia, y Epidemicidad en el Microorganismo Patógeno Nosocomial *Acinetobacter baumannii* mediante Análisis Proteómico. Xunta de Galicia. 2007-2010. IP: Germán Bou.**
- Referencia: IN842A08/50-0. **Antibióticos: Unha conquista da humanidade que estamos botando a perder. Xunta de Galicia. 2008. IP: Esteban Fernández.**
- Referencia: PI11/01034. **Genómica y transcriptómica de *biofilms* de *A. baumannii*. Ministerio de Ciencia e Innovación. 2012-2014. IP: Margarita Poza.**

Publicaciones:

-
- 2005**
- Velasco, D., del Mar Tomás, M., Cartelle, M., Beceiro, A., Pérez, A., Molina, F., Moure, R., Villanueva, R., Bou, G. 2005. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother 55: 379-82 (Índice de impacto: **4,352**)
 - Del Mar Tomás, M., Beceiro, A., Pérez, A., Velasco, D., Moure, R., Villanueva, R., Martínez-Beltrán, J., Bou, G. 2005. Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother 49: 5172-5 (Índice de impacto: **4,802**)
- 2007**
- Fernández, A., Gil, E., Cartelle, M., Pérez, A., Beceiro, A., Mallo, S., Tomás, M.M., Pérez-Llarena, F.J., Villanueva, R., Bou, G. 2007. Interspecies spread of CTX-M-32 extended-spectrum beta-lactamase and the role of the insertion sequence IS1 in down-regulating bla CTX-M gene expression. J. Antimicrob. Chemother. 59: 841-7. (Índice de impacto: **4,352**)
 - Beceiro, A., Pérez-Llarena, F.J., Pérez, A., Tomás, M.del M., Fernández, A., Mallo, S., Villanueva, R., Bou, G. 2007. Molecular characterisation of the gene encoding a new AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baylyi*. J. Antimicrob. Chemother. 59: 996-1000. (Índice de impacto: **4,802**)
 - Perez, A., Canle, D., Latasa, C., Poza, M., Beceiro, A., Del Mar Tomas, M., Fernandez, A., Mallo, S., Perez, S., Molina, F., Villanueva, R., Lasa, I., Bou, G. 2007. Cloning, Nucleotide Sequencing and Analysis of the AcrAB-TolC Efflux Pump of *Enterobacter cloacae* and its Involvement in Antibiotic Resistance in a Clinical Isolate. Antimicrob. Agents Chemother. 51:3247-53 (Índice de impacto: **4,802**)
- 2008**
- Pérez-Llarena, F.J., Cartelle, M., Mallo, S., Beceiro, A., Pérez, A., Villanueva, R., Romero, A., Bonnet, R., Bou, G. 2008. Structure-function studies of arginine at position 276 in CTX-M beta-lactamases. J. Antimicrob. Chemother. 61:792-7. (Índice de impacto: **4,352**)
 - Beceiro A, Pérez A, Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Pascual A, Vila J, Rodríguez-Baño J, Cisneros JM, Pachón J, Bou G; the Spanish Group for Nosocomial Infection (GEIH). 2008. Genetic variability among *ampC* genes from *Acinetobacter* genomic species 3. Antimicrob. Agents Chemother. 53:1177-84 (Índice de impacto: **4,802**)
- 2011**
- Pérez A, Poza M, Fernández A, Fernández M C, Mallo S , Merino M, Rumbo-Feal S, Cabral M P, Bou G. 2011. Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness and virulence of *Enterobacter cloacae*. Antimicrob. Agents Chemother. (Índice de impacto: **4,802**)
 - Fernández A, Pérez A, Ayala J A, Mallo S, Rumbo-Feal S ,Tomás M, Poza M, Bou G. 2011. Expression of OXA-type and SFO-1 β -lactamases induces changes in peptidoglycan composition and affects bacterial fitness. Antimicrob. Agents Chemother. (Índice de impacto: **4,802**)

Lecturas, comunicaciones y posters:

-
- 2005**
- M. TOMAS, A. BECEIRO, A. PEREZ, R. VILLANUEVA, G. BOU. Cloning, Nucleotide Sequencing and Analysis of the Gene Encoding the 34KDa Outer Membrane Protein (OMP) of *Acinetobacter baumannii*. 45th ICAACTM Abstracts; Washington, DC ; December 16-19, 2005.
 - PEREZ, A. BECEIRO, F.J. PEREZ-LLARENA, G. BOU. Structure-Function Studies in Class C Beta. Lactamases: AmpC of *Acinetocacter* spp. As a Model. . 45th ICAACTM Abstracts; Washington, DC ; December 16-19, 2005.
- 2006**
- S. MALLO, M. CARTELLE, F.J. PEREZ-LLARENA, A. BECEIRO, A. PEREZ, M. TOMAS, R. VILLANUEVA, G. BOU. Studies of the Amino Acids (from the Class C β -Lactamase, FOX-4) Involved in the Hydrolysis of Cefoxitin (FX) and Ceftazidime (TZ). . 46th ICAACTM Abstracts; San Francisco, CA September 27-30, 2006.

- **A.BECEIRO, F.J. PEREZ-LLARENA, A. PEREZ, M. CARTELLE, S. MALLO, M. TOMAS, R. VILLANUEVA, G. BOU.** Molecular Characterization of a New Class C Beta- Lactamase in *Acinetobacter* spp. 46th ICAACTM Abstracts; San Francisco, CA September 27-30, 2006.
- **A.BECEIRO, A. PEREZ, F.J. PEREZ-LLARENA, R. VILLANUEVA Y G. BOU.** Molecular Characterization of a New AmpC beta-lactamases in *Acinetobacter* spp. XII Congress SEIMC 2006;24(Espec Congr): 1-250.
- 2007** • **M. TOMAS, S. PITA, A. PEREZ, S. PERTEGA, A. BECEIRO, F. LUEIRO, R. VILLANUEVA Y G. BOU.** Risk Factors Associated with Acquisition of bacteremia by Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).. XII Meeting SEIMC 2007;25(Espec Congr): 1-118.
- **M. TOMAS, S. PITA, A. PEREZ, A. FERNANDEZ, S. PERTEGA, S. MALLO, F. LUEIRO, R. VILLANUEVA Y G. BOU.** Risk Factors Associated with Mortality from bacteremia Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). XII Meeting SEIMC 2007;25(Espec Congr): 1-118.
- 2008** • **J. RODRÍGUEZ-BAÑO, A. BECEIRO, F. FERNÁNDEZ-CUENCA, A. PÉREZ, A. PASCUAL, G. BOU.** *Acinetobacter baumannii* with Low MICs to Clavulanic Acid: Correlation with MICs to Other Antimicrobials and Risk Factors. 48th ICAAC/46th IDSA Abstracts;Washington,DC October 25-28, 2008.
- **A. PÉREZ, MJ. BARBA, A. FERNÁNDEZ, M. POZA, A. BECEIRO, C. GAYOSO, MD. SOUSA, R. VILLANUEVA, Y G. BOU.** Mechanisms associated with reduced susceptibility to tigecycline (TGC) in a clinical isolate of *Escherichia coli* carrying a extended spectrum beta-lactamase (ESBL). XIII Congress SEIMC, 2008.
- 2009** • **A. FERNÁNDEZ, M. POZA, A. PÉREZ, J.A. SAEZ-NIETO, R. VILLANUEVA, G. BOU.** Investigation of a nosocomial outbreak caused by MDR *Enterobacter cloacae* (Ec) SFO-1 beta-lactamase producer. XIII Meeting SEIMC, 2009. (Prize for the best communication)
- **M.J. BARBA, C. GAYOSO, A. PÉREZ, R. VILLANUEVA, G. BOU.** Molecular basis of resistance to carbapenems in a clinical strain of *Escherichia coli*. XIII Meeting SEIMC, 2009.
- 2010** • **AcrAB-TolC Efflux Pump is regulated by RamA, SoxS and RobA in a clinical isolated of *Enterobacter cloacae*.** COST ACTION - Antibiotic transport and efflux: new strategies to combat bacterial resistance. 2010. Bremen, Alemania.
- **A. PÉREZ, M. POZA, C. LATASA, A. FERNÁNDEZ, D. RAMOS, I. LASA, R. VILLANUEVA, G. BOU.** Regulations of AcrAB-TolC antimicrobial efflux pump of *Enterobacter cloacae* by RobA and SoxS proteins. XIV Congress SEIMC, 2010.
- **Papel de la bomba de expulsión AcrAB-TolC de *Enterobacter cloacae* en patógenesis.**Societat Catalana de Malalties Infeccioses i Microbiologia Clínica. 2010. Ibiza, España.
- 2011** • **A. PÉREZ, M. POZA, M. FERNANDEZ, E. LOPEZ, A. FERNANDEZ, S. MALLO, M. MERINO, S. RUMBO-FEAL, M. POVOA, G. BOU.** Reduction of the fitness of *Enterobacter cloacae* due to the loss of a structural component of AcrAB-TolC efflux pump. XV Congress SEIMC, 2011.

Idiomas:

| | |
|-------------------|--------------|
| Galego: | Nativo |
| Español: | Nativo |
| Inglés: | Intermedio |
| Portugués: | Principiante |

